

**ÜBER DEN TRANSPORT CYTOPLASMATISCH
SYNTHETISierter PROTEINE
IN DIE MITOCHONDRIEN VON
NEUROSPORA CRASSA**

Gerhard Hallermayer

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0082

ÜBER DEN TRANSPORT CYTOPLASMATISCH SYNTHETISIERTER PROTEINE
IN DIE MITOCHONDRIEN VON NEUROSPORA CRASSA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Gerhard Hallermayer
aus Friedberg

München 1977

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. W. Neupert
Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 5. 1977



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1973 bis Dezember 1976 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Th. Bücher und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. W. Neupert.

Herrn Prof. Dr. Bücher danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Dem Anreger der vorliegenden Arbeit, Herrn Dr. W. Neupert danke ich für sein unermüdliches Interesse und die stets ermunternde Unterstützung.

Die freundschaftliche Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. Michel und Herrn Dr. M. Harmey war mir eine große Hilfe.

Für die Anfertigung zahlreicher elektronenmikroskopischer Aufnahmen möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Miller und Frau G. Lusch danken.

Mein besonderer Dank gilt Frl. Heide Rothe und Frl. Dietlinde Rose, deren geschickte technische Assistenz zum Gelingen der oft umfangreichen und langwierigen Experimente wesentlich beigetragen hat.

Schließlich sei an dieser Stelle gedankt Frau M. Krammer für die Bereitstellung der Neurospora-Kulturen, sowie Herrn H. Steiner und Frau H. Ecker für die gewissenhafte Pflege der Kaninchen und nicht zuletzt den Kaninchen selbst, die durch die Produktion und Spende hochspezifischer Antikörper mit zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. PLAN	6
3. ERGEBNISSE	9
3.1. Untersuchung der Struktur und Funktion von cytoplasmatischen Ribosomen in Präparationen von isolierten Mitochondrien: Abklärung der Hypothese, daß Außenmembran gebundenen Ribosomen eine spezifische Funktion in Translation und Translokation cytoplasmatisch synthetisierter Mitochondrienproteine zukommt	9
3.1.1. Untersuchung der Zugehörigkeit der aus Mitochondrienfraktionen von <i>Neurospora crassa</i> isolierbaren 79-S Ribosomen zum cytoplasmatischen Translationssystem	10
3.1.1.1. Ribosomengehalte von Mitochondrienfraktionen in Abhängigkeit von den Isolierungsbedingungen	10
3.1.1.2. Charakterisierung der aus Mitochondrienfraktionen isolierbaren Ribosomen durch Dichtegradienten-Zentrifugation	12
3.1.1.3. Wirkung von Heparin auf das Sedimentationsverhalten der Ribosomen im Dichtegradienten	17
3.1.1.4. Untersuchung der ribosomalen RNS-Spezies von Mitochondrienfraktionen nach Aufschluß der Zellen in verschiedenen Isolierungsmedien	19
3.1.1.5. Immunologische Identifizierung der in Mitochondrienfraktionen enthaltenen Ribosomen	23

	Seite
3.1.2. Identifizierung der Membranen der Mitochondrienfraktionen, die mit cytoplasmatischen Ribosomen besetzt sind: Charakterisierung einer Mikrosomenfraktion aus <i>Neurospora crassa</i>	36
3.1.2.1. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen	36
3.1.2.2. Charakterisierung der Zellfraktionen durch ihre RNS-Gehalte und Marker-Enzymaktivitäten	46
3.2. Kinetik des Transports cytoplasmatisch synthetisierter Proteine in die Mitochondrien <u>in vivo</u> und <u>in vitro</u>	51
3.2.1. Markierungskinetik des Gesamtproteins und immunologisch identifizierbarer Mitochondrienproteine in den Zellfraktionen durch Einbau von ^3H -Leucin <u>in vivo</u>	51
3.2.1.1. Puls- und Puls-Chase-Markierung des Gesamtproteins der Zellfraktionen	51
3.2.1.2. Immunpräzipitation mitochondrien-spezifischer Proteine aus solubilisierten Mitochondrien	55
3.2.1.3. Kinetik des Erscheinens mitochondrien-spezifischer Proteine in den Mitochondrien	58
3.2.1.4. Erfassung extramitochondrialer Pools von mitochondrialen Proteinen	64
3.2.1.5. Einfluß von Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) und Cycloheximid (CHI) auf den Transport von Proteinen in die Mitochondrien	70

	Seite
3.2.2. Synthese und Transport von Mitochondrien-Proteinen in einem zellfreien Proteinsynthesystem des Neurospora-Homogenates	76
3.2.2.1. <u>In vitro</u> -Proteinsynthese in einem Zellhomogenat	76
3.2.2.2. Einbaukinetik von <u>in vitro</u> synthetisierten Polypeptiden in die Mitochondrien	78
3.2.2.3. Markierungskinetik der nichtmitochondrialen Zellfraktionen	80
3.2.2.4. Synthese und Transport von Matrixproteinen <u>in vitro</u>	82
3.2.2.5. Synthese und Transport von Cytochrom c und CAT-bindendem Protein <u>in vitro</u>	87
3.3. Untersuchungen zur Lokalisierung des Translationsortes der chromosomal kodierten Mitochondrien-Proteine an freien oder membrangebundenen Ribosomen	91
3.3.1. Experimente zur immunologischen Identifizierung mitochondrien-spezifischer Translationsprodukte an freien und membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen	91
3.3.2. Lokalisierung des Translationsortes von Mitochondrienproteinen durch <u>in vitro</u> -Proteinsynthese isolierter Zellfraktionen	98
4. EXPERIMENTELLER TEIL	105
4.1. Züchtung von Neurospora und homogene Markierung des Zellproteins mit radioaktiven Aminosäuren bzw. ^{35}S -Sulfat	105
4.2. Zellaufschluß und Fraktionierung	106

	Seite
4.2.1. Zellaufschluß und Fraktionierung zur Iso- lierung von Ribosomen	106
4.2.2. Zellaufschluß und Fraktionierung nach Puls- und Puls-Chase-Markierung ganzer Zellen	106
4.2.3. Zellaufschluß und Fraktionierung für <u>in</u> <u>vitro</u> -Markierungsexperimente mit dem Zellhomogenat	107
4.2.4. Zellaufschluß und Fraktionierung für <u>in vitro</u> -Markierungsexperimente mit iso- lierten Zellfraktionen	108
4.3. Isolierung und Analyse von Ribosomen	109
4.3.1. Isolierung von cytoplasmatischen Ribosomen	109
4.3.2. Isolierung von Ribosomen aus Mitochon- drienfraktionen	109
4.3.3. Ribosomenisolierung in Gegenwart von Heparin	109
4.3.4. Isolierung von E. coli-Ribosomen	110
4.3.5. Gradientenzentrifugation von Ribosomen	110
4.3.6. Immunpräzipitation von mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomen	110
4.3.7. Extraktion und Auftrennung von Nuklein- säuren	111
4.4. Immunpräzipitation aus solubilisierten Zellfraktionen	113
4.4.1. Herstellung der Antigene aus Neurospora	113
4.4.1.1. Isolierung von mitochondrialen und cyto- plasmatischen Ribosomen	113
4.4.1.2. Isolierung von Cytochrom c *	114
4.4.1.3. Isolierung von Carboxyatractylosid-bin- dendem Protein (CAT-bindendes Protein)	115
4.4.1.4. Isolierung der mitochondrialen Matrix	116
4.4.2. Immunisierung von Kaninchen	117

	Seite
4.4.3. Gewinnung von Antiseren und Immunglobulinen	117
4.4.4. Titerbestimmung der Antiseren und Immunglobulin-Präparationen	118
4.4.5. Immunpräzipitation aus solubilisierten Zellfraktionen	118
4.4.6. Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese der Immunpräzipitate	119
4.5. Puls- und Puls-Chase-Markierung von ganzen Zellen	120
4.6. <u>In vitro</u> -Proteinsynthese im Zellhomogenat	121
4.7. <u>In vitro</u> -Proteinsynthese in isolierten Zellfraktionen	122
4.8. Elektronenmikroskopie	123
4.9. Bestimmungsmethoden	124
4.9.1. Proteinbestimmung	124
4.9.2. RNS-Bestimmung	124
4.9.3. Enzym- und Cytochrom-Bestimmungen	124
4.9.4. Radioaktivitätsmessung	125
4.10. Verwendete Materialien	126
5. DISKUSSION	127
5.1. Mögliche Aussagen über den Mechanismus des Transports auf der Basis von <u>in vivo</u> - und <u>in vitro</u> -Pulsmarkierungs-Experimenten	130
5.1.1. Kinetik des Erscheinens neusynthetisierter Peptidketten in den Mitochondrien	131
5.1.2. Blockierung der Translation durch Cycloheximid	134
5.1.3. Vorstufen-Pools von cytoplasmatisch synthetisierten Mitochondrienproteinen im extramitochondrialen Raum	135

	Seite
5.2. Das Modell eines Transports von Mitochondrienproteinen durch Außenmembran-gebundene cytoplasmatische Ribosomen	138
5.3. Diskussion möglicher Mechanismen für den Transport von cytoplasmatisch synthetisierten Mitochondrienproteinen	140
5.4. Ausblick	144
6. ZUSAMMENFASSUNG	145
7. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	148
8. LITERATURVERZEICHNIS	149

1. EINLEITUNG

Die Erforschung der Biogenese des Mitochondriums hat sich bisher vorwiegend an zwei grundlegenden Erkenntnissen orientiert:

1. Die Bildung der Mitochondrien in der Zelle erfolgt durch Wachstum und Teilung bereits vorhandener Mitochondrien (1, 2).
2. Die Beobachtung, daß atmungsdefiziente Hefemutanten ihre Unfähigkeit zu atmen nicht nach den Mendel'schen Erbgesetzen weitergeben, führt zu dem Schluß, daß Erbfaktoren außerhalb des Zellkerns für die Atmungsfähigkeit der Hefezellen verantwortlich sein müssen (3, 4).

Nach der Entdeckung von genetisch aktiver DNS in den Mitochondrien (5, 6, 7), die über ein mitochondrienspezifisches System zur Replikation, Transkription und Translation verfügt (8, 9, 10), hat sich das Interesse der Mitochondriologen vorwiegend auf den Beitrag des mitochondrialen Genoms zur Biogenese des Mitochondriums konzentriert. Dabei wurde klar, daß das mitochondriale System nur wenige Polypeptidketten liefert, die alle in die mitochondriale Innenmembran integriert werden und als essentielle Komponenten komplexer Enzyme der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung fungieren (zusammenfassende Darstellungen siehe (8 - 12)). Dieser Sachverhalt konnte bisher für drei Komplexe nachgewiesen werden.

Die Cytochromoxidase aus *Neurospora crassa* (13, 14, 15) und Hefe (16, 17) ist ein Komplex aus 7 Untereinheiten mit Molekulargewichten zwischen 8 000 und 40 000. Die drei größeren Untereinheiten sind mitochondrialen Ursprungs. Die vier kleineren Untereinheiten werden dagegen an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet. Ebenso konnten in einer Präparation von Cytochrom b aus *Neurospora crassa* ein oder zwei mitochondrial synthetisierte Polypeptide nachgewiesen werden, die wahrscheinlich die Häm tragenden Polypeptide darstellen (18). Für die oligomycinsensitive ATPase aus *Neurospora crassa* konnte für mindestens zwei von insgesamt 14 Untereinheiten eine Synthese an mitochondrialen Ribosomen gezeigt werden (19). Ähnlich liegen die Verhältnisse bei

der oligomycin-sensitiven ATPase aus Hefe. Hier sind 4 mitochondrial synthetisierte Peptidketten mit 5 Peptidketten cytoplasmatischen Ursprungs assoziiert (20, 21).

Der Anteil der mitochondrial synthetisierten Komponenten konnte durch Pulsmarkierungs-Experimente in Gegenwart von spezifischen Hemmstoffen der cytoplasmatischen Proteinsynthese auf 5 - 15 % des Gesamt-Mitochondrienproteins abgeschätzt werden. Der Hauptteil der mitochondrialen Proteine - der größte Teil der Proteine der mitochondrialen Innenmembran, die Proteine der Außenmembran und die Proteine der mitochondrialen Matrix - wird an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert (Übersichtsartikel siehe (12)).

Diese Erkenntnisse wurden bestätigt einerseits durch die Untersuchung von Mutanten, die die Fähigkeit zur mitochondrialen Proteinsynthese vollständig verloren haben, andererseits durch Markierungsexperimente an isolierten Mitochondrien mit radioaktiven Aminosäuren (12).

Neben den bereits erwähnten cytoplasmatisch gebildeten Komponenten der Innenmembrankomplexe konnte eine extramitochondriale Translation für die Proteinkomponenten des mitochondrialen Proteinsynthesystems einschließlich der Proteine der mitochondrialen Ribosomen (10, 12, 22 - 29), für die Enzyme des Citratzyklus (30 - 33), die Ferrochelatase (34), die Malatdehydrogenase (35, 36, 37), die mitochondriale F_1 -ATPase (10, 12, 21, 38, 39), das OSCP (21, 40), das Cytochrom c (12, 41, 42) und das Carboxyatractylosidbindende Protein (43) nachgewiesen werden.

Dieses Bild wird ergänzt durch genetische Befunde. Sie haben gezeigt, daß die Kodierungskapazität der mitochondrialen DNS nur für wenige Polypeptide ausreicht (29). Neben der Translation an cytoplasmatischen Ribosomen wird damit auch eine chromosomale Kodierung für den größten Teil der mitochondrialen Proteine wahrscheinlich gemacht. Ein Transport kernkodierter m-RNS in die Mitochondrien und deren Translation an mitochondrialen Ribosomen kann z. Z. nicht generell ausgeschlossen werden (9, 10, 12, 44, 45). Für die Mehrzahl der Proteine jedoch gilt eine Translation an cytoplasmatischen Ribosomen als gesichert.

Der extramitochondriale Ursprung dieser Proteine erfordert spezifische Mechanismen des Transports vom Ort ihrer Synthese im extramitochondrialen Raum bis zu ihrem Wirkungsort jenseits zweier Membranbarrieren im Matrixraum oder in den mitochondrialen Membranen.

Der für die Bildung der Mitochondrien erforderliche Prozeß des Transports von Proteinbausteinen in das Mitochondrium gilt heute als ein noch weitgehend ungeklärtes, zentrales Problem der Mitochondrienbiogenese. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sollen dazu beitragen, die bei diesem Prozeß wirksamen Mechanismen aufzuklären.

Betrachtet man zunächst das breite Spektrum der kernkodierten Mitochondrienproteine, das Polypeptide mit sehr unterschiedlichen Molekulargewichten umfaßt, die z. T. stark hydrophilen, z. T. stark hydrophoben Charakter besitzen, so läßt sich schwerlich ein gemeinsames Strukturmerkmal erkennen, das diese Proteine gegenüber den im Cytosol lokalisierten Proteinen auszeichnet. Die Information, zunächst in das Mitochondrium transportiert zu werden und dann erst die spezifische Wirkung zu entfalten, muß letztlich in der Basensequenz der m-RNS-Moleküle dieser Proteine niedergelegt sein. Wie aber wird diese spezifische Information realisiert?

Im wesentlichen bieten sich drei Möglichkeiten an:

1. Das mitochondrien-spezifische m-RNS-Molekül bildet bereits im Cytoplasma einen funktionsfähigen Komplex aus kleiner und großer Ribosomenuntereinheit. Die Synthese beginnt im Cytoplasma und die naszierenden Peptidketten erkennen die mitochondriale Außenmembran oder die Membranen des endoplasmatischen Retikulums; die Translation wird entweder im Cytosol oder an der Membran vollendet. Dabei wäre es denkbar, daß eine bereits im m-RNS-Molekül aller kernkodierten Mitochondrienproteine vorprogrammierte, evtl. apolare Aminosäuresequenz ausschließlich der Erkennung der Membran und der Erleichterung des Transports durch die Membran dient. Im Falle einer direkten Erkennung der mitochondrialen Außenmembran könnte nach proteolytischer Abspaltung dieses Hilfspeptids das funktionell wirksame Mitochondrienprotein in der Membran selbst oder an der Matrixsei-

te der Innenmembran freigesetzt werden. Ein ähnlicher Mechanismus ist von Blobel und Dobberstein (46, 47) für den Transport von Exportproteinen in sekretorischen Zellen vorgeschlagen worden.

2. Das mitochondrien-spezifische m-RNS-Molekül selbst erkennt einen Rezeptor an der mitochondrialen Außenmembran oder am endoplasmatischen Retikulum. Diese Rezeptoren sind in der Membran lokalisiert (48) oder sie stehen als membrangebundene cytoplasmatische Ribosomen oder Ribosomenuntereinheiten an der mitochondrialen Außenmembran (49 - 55) oder am rauen endoplasmatischen Retikulum zur Verfügung.

In beiden Fällen beginnt die Initiierung an einer der beiden Membranen, gefolgt von einer gleichzeitigen Translation und vektoriiellen Translokation durch die mitochondrialen Membranen oder in den von den Membranen des endoplasmatischen Retikulums umschlossenen Raum. Für den Fall einer Synthese am rauen endoplasmatischen Retikulum sind für den Transport mitochondrien-spezifischer Proteine aus dem Lumen des Retikulums in die Mitochondrien zwei Möglichkeiten denkbar.

Entweder es besteht ein Kontinuum zwischen Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums und der mitochondrialen Außenmembran (56 - 61) oder der Inhalt des endoplasmatischen Retikulums wird durch Membran-Fusion in das Mitochondrium transportiert. Die erste Möglichkeit impliziert allerdings zumindest für die Matrixproteine und für Membranproteine, die zur Innenseite zeigen, einen weiteren Translokationsmechanismus durch die mitochondriale Innenmembran.

3. Die dritte Hypothese besteht in einer Translation an freien oder membrangebundenen Ribosomen und Freisetzung der mitochondrien-spezifischen Polypeptidketten in das Cytosol. Die Peptidketten gelangen durch freie Diffusion an die mitochondriale Außenmembran und werden durch spezifische Transportmechanismen durch beide Mitochondrienmembranen geschleust. Bei einem solchen Mechanismus müßte allerdings verhindert werden, daß die mitochondrialen Proteine bereits im Cytosol wirksam werden. Denkbar wäre die Bildung eines Protein-Phospholipid- oder

Protein-Protein-Carrier-Komplexes oder auch eine Umfaltung während des Transports durch die Membran.

2. PLAN

Für Untersuchungen zur Biogenese der Mitochondrien und insbesondere zur experimentellen Erfassung des Proteintransports in wachsende Mitochondrien erscheint es sinnvoll, einen sich schnell vermehrenden Organismus zu wählen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit dem roten Brotschimmel *Neurospora crassa* durchgeführt.

Neurospora crassa kann leicht in submersen Kulturen gezüchtet werden und zählt mit einer Verdoppelungszeit von etwa 4 h zu den schnell wachsenden Organismen. Radioaktive Aminosäuren werden sehr schnell aus dem Kulturmedium aufgenommen. Dies ist wichtig für die Durchführung von Puls- und Puls-Chase-Markierungsexperimenten mit ganzen Zellen. Weiterhin ist es für den Fall einer Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums am Transport von Proteinen in die Mitochondrien von Vorteil, daß die *Neurospora*-Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen keine Proteine, wie z. B. Proteasen, in das Kulturmedium exportieren (62). Eine Funktion des rauen endoplasmatischen Retikulums als Syntheseort von Exportproteinen wird damit weitgehend ausgeschlossen.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war der Befund, daß aus *Neurospora* ebenso wie aus Hefe (49, 50) in Gegenwart von Mg-Ionen Mitochondrien isoliert werden können, die 3- bis 4mal so viele Ribosomen enthalten als Mitochondrien, die in Gegenwart von EDTA isoliert worden sind. Da Mg-Ionen im Gegensatz zu EDTA sowohl den Aufbau der Ribosomen aus großen und kleinen Untereinheiten als auch die Bindung von Ribosomen mit Membranen aufrechterhalten, war es naheliegend, die durch Isolierung von Mitochondrien in Mg-haltigem Medium zusätzlich isolierbaren Ribosomen in bezug auf eine mögliche Bindung an die mitochondriale Außenmembran zu untersuchen. Dieser Befund ist vor allem interessant im Zusammenhang mit der Hypothese, daß cytoplasmatische Ribosomen direkt an die mitochondriale Außenmembran gebunden sind und durch gleichzeitige Translation und vektorielle Translokation die kernkodierten Proteine in die Mitochondrien transportieren. Ziel der in Kapitel 3.1. beschriebenen Experimente ist es, diese Hypothese abzuklären.

Zunächst war es notwendig, den cytoplasmatischen Ursprung der Ribosomen nachzuweisen, die durch Isolierung von Mitochondrien in Mg-haltigem Medium zusätzlich isolierbar sind (3.1.1.). Diese Experimente wurden durchgeführt im Hinblick auf die von Datema et al. (63) beschriebene Interpretation von Ergebnissen, die diesen Ribosomen einen mitochondrialen Ursprung zuschreibt. In Kapitel 3.1.2. wird die Frage untersucht, mit welchen Membranen diese cytoplasmatischen Ribosomen assoziiert sind.

Die Frage nach der Funktion der an das endoplasmatische Retikulum gebundenen cytoplasmatischen Ribosomen wurde bisher im wesentlichen an sekretorischen Zellen untersucht (Übersichtsartikel siehe (64 - 67)). Die Funktion des rauhen endoplasmatischen Retikulums in nichtsekretorischen Zellen ist bisher ungeklärt. Betrachtet man aber die phylogenetische Entwicklung der eukaryotischen Zelle im Sinne der 'Endosymbionten-Theorie', so erscheint es gerechtfertigt, dem von der mitochondrialen Außenmembran umschlossenen Raum einen extrazellulären Charakter zuzuschreiben.

Zur Klärung der Frage, inwieweit in nichtsekretorischen Neurospora-Zellen das endoplasmatische Retikulum für die Synthese und den Transport von Mitochondrienproteinen verantwortlich ist, wurden Puls- und Puls-Chase-Markierungsexperimente an ganzen Zellen durchgeführt. Zusammen mit einer immunologischen Identifizierung von pulsmarkierten Mitochondrienproteinen kann von einer kinetischen Analyse einzelner Proteine in den verschiedenen Zellfraktionen eine Aussage über die Bedeutung nichtmitochondrialer Zellfraktionen für den Transport von Proteinen in die Mitochondrien erwartet werden. Die an ganzen Zellen in vivo erhaltenen Ergebnisse wurden zunächst in vitro in einem zellfreien Proteinsynthesesystem überprüft.

Zur Identifizierung des Syntheseorts von Mitochondrienproteinen an membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums oder an freien cytoplasmatischen Ribosomen wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt. Zunächst wurde versucht, naszierende mitochondriale Matrixpeptide an isolierten freien und membrangebundenen Ribosomen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu identifizieren. Eine ähnliche Aussage ist von einer in vitro-Proteinsynthese isolierter Zellfraktionen (der

Mikrosomenfraktion und den freien Ribosomen) und dem immunologischen Nachweis mitochondrienspezifischer Proteine zu erwarten.

Auch die Inkubation von Mikrosomen bzw. freien Ribosomen mit Mitochondrien und die in vitro-Proteinsynthese dieser Ansätze sollte es erlauben, die Synthese von Mitochondrienproteinen an freien oder membrangebundenen Ribosomen und den Transport in die Mitochondrien nachzuweisen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchung der Struktur und Funktion von cytoplasmatischen Ribosomen in Präparationen von isolierten Mitochondrien: Abklärung der Hypothese, daß Außenmembran gebundenen Ribosomen eine spezifische Funktion in Translation und Translokation cytoplasmatisch synthetisierter Mitochondrienproteine zukommt

Unter den möglichen Translokationsmechanismen für cytoplasmatisch synthetisierte Mitochondrienproteine erscheint die von Butow (49 - 53) formulierte Hypothese besonders attraktiv. Trifft dieses Modell zu, so sollte es möglich sein, eine funktionelle Bindung von cytoplasmatischen Ribosomen an die mitochondriale Außenmembran nachzuweisen.

Zur Isolierung von Mitochondrien wird in der Regel EDTA-haltiges Medium zum Zellaufschluß verwendet. EDTA bewirkt durch Komplexbindung von Mg-Ionen sowohl eine Dissoziation der Ribosomen in ihre Untereinheiten als auch eine Freisetzung von membrangebundenen Ribosomen. Da die mitochondriale Innenmembran für EDTA nicht permeabel ist, können unter diesen Bedingungen weitgehend von cytoplasmatischen Ribosomen befreite, funktionell aktive mitochondriale Ribosomen isoliert werden (68). Für *Neurospora crassa* wurde dem mitochondrialen Monosom eine Sedimentationskonstante von 73-S zugeordnet (29, 69). Zur Isolierung von cytoplasmatischen Ribosomen (77 - 81-S für das Monosom aus *Neurospora crassa* (69)) muß dagegen Mg-haltiges Medium zum Zellaufschluß verwendet werden.

Die Untersuchung der in Gegenwart von Mg-Ionen isolierten Mitochondrien muß von zwei Fragen ausgehen:

1. Lassen sich die gemeinsam mit den mitochondrialen Ribosomen zusätzlich isolierbaren 79-S Ribosomen eindeutig dem cytoplasmatischen Translationsapparat zuordnen?
2. Wenn ja, sind diese cytoplasmatischen membrangebundenen Ribosomen funktionell mit den Mitochondrien assoziiert oder gelangen sie als Kontamination in die Mitochondrienfraktion?

3.1.1. Untersuchung der Zugehörigkeit der aus Mitochondrienfraktionen von *Neurospora crassa* isolierbaren 79-S Ribosomen zum cytoplasmatischen Translationssystem

Werden *Neurospora* Zellen in Mg-haltigem Medium aufgeschlossen und die Mitochondrien sedimentiert, so lassen sich daraus neben den intramitochondrialen Ribosomen (73-S) zusätzlich und quantitativ überwiegend solche mit einer Sedimentationskonstante isolieren, die der von freien cytoplasmatischen Ribosomen entspricht (70 - 72).

Im Falle von Hefemitochondrien werden sowohl biochemische als auch elektronenmikroskopische Experimente beschrieben, die für einen extramitochondrialen Wirkungsort dieser Ribosomen sprechen (49 - 53).

Im Gegensatz zu den bisher allgemein akzeptierten Befunden, die in allen bisher untersuchten Organismen den mitochondrialen Ribosomen eine niedrigere Sedimentationskonstante als den cytoplasmatischen Ribosomen zuordnen lassen (29), wird von einer Arbeitsgruppe für *Neurospora crassa* eine kontroverse Ansicht vertreten (63, 73, 74). Eine Reihe von Experimenten wurde dahingehend interpretiert, daß die in Gegenwart von Mg-Ionen aus *Neurospora*-Mitochondrien isolierbaren Ribosomen mit höherer Sedimentationskonstante (80-S) die nativen mitochondrialen Ribosomen von *Neurospora crassa* darstellen. Die daneben noch auftretenden, bisher als mitochondrial beschriebenen 73-S Ribosomen werden dagegen als Isolierungsartefakt betrachtet.

Diese gegensätzlichen Interpretationen zwingen zu einer besonders gründlichen Untersuchung der aus Mitochondrien isolierbaren 79-S Ribosomen.

3.1.1.1. Ribosomengehalte von Mitochondrienfraktionen in Abhängigkeit von den Isolierungsbedingungen

Die Isolierung von *Neurospora*-Mitochondrien in Gegenwart von Mg-Ionen (SAMT-Mitochondrien) bewirkt einen um den Faktor 3 - 4 er-

höhten Ribosomengehalt verglichen mit einer Isolierung in EDTA-haltigem Medium (Tabelle 1).

Tabelle 1 Schema der verschiedenen Isolierungsmethoden für Mitochondrien und deren spezifische Ribosomengehalte.

A: 0,44 M Saccharose, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6

B: 0,44 M Saccharose, 0,1 M NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 30 mM Tris-HCl, pH 7,6

C: 0,44 M Saccharose, 0,1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6

Zur Bestimmung des Ribosomengehaltes wurden aus der jeweiligen Mitochondrienpräparation die Ribosomen isoliert und ihre Menge durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (siehe 4.3.2. und 4.9.2.).

Bezeichnung der Mitochondrien-Präparation	SE _{1,0} ^T	SAMT		SME	SE _{0,1} ^T	
Isolierungsmedium	A	B		B	C	
Waschmedium	2xA	0xB	1xB	2xB	2xA	2xC
OD ₂₆₀ /mg Protein	0,79	2,36	2,48	2,40	1,44	0,81

EDTA-Konzentrationen von 1 mM und 0,1 mM führen zu gleichen Ribosomenanteilen. Mehrmaliges Waschen der in Mg-Medium (Medium B) isolierten Mitochondrien durch Resuspendieren und Rezentrifugieren führt zu keiner Verringerung des Ribosomengehaltes. Präparation der Mitochondrien in Mg-Medium (Medium B) und zweimaliges Waschen in 1 mM EDTA (Medium A) ergibt einen Ribosomengehalt, der zwischen den EDTA- und Mg-Präparationen liegt.

Die Daten in Tabelle 1 lassen eine Kontamination durch freie cytoplasmatische Ribosomen ausschließen. Es handelt sich offensichtlich um membrangebundene Ribosomen, die entweder gebunden an mitochondriale Membranen sedimentieren oder aber an Strukturen fixiert sind, die ein mitochondrienähnliches Sedimentationsverhalten zeigen.

Tabelle 2 Verteilung der Ribosomen auf die Mitochondrienfraktion und den postmitochondrialen Überstand nach Aufschluß der Zellen in SAMT- und $SE_{1,0}^T$ -Medium.

Die Mitochondrienfraktionen wurden zweimal mit dem jeweiligen Isolierungsmedium gewaschen. Die Ribosomen wurden aus den Fraktionen isoliert und ihre Menge bestimmt (siehe Tabelle 1). Zur Berechnung der Ribosomenanteile in den Mitochondrienfraktionen wurde die Mitochondrienausbeute mit 25 % berücksichtigt (75).

	% der gesamten zellulären Ribosomen	
	Mitochondrien	postmitochondrialer Überstand
SAMT	5,0	95,0
$SE_{1,0}^T$	1,2	98,8

Tabelle 2 gibt Aufschluß über den prozentualen Anteil der Ribosomen in Mitochondrienfraktionen und deren postmitochondrialen Überständen, bezogen auf die Gesamtribosomenmenge des Zellhomogenates. Durch Subtraktion der Ribosomengehalte von Mg- und EDTA-Präparationen ergibt sich für die durch Mg-Ionen zusätzlich in die Mitochondrienfraktion gelangenden Ribosomen ein Anteil von etwa 3,8 % der gesamten zellulären Ribosomen.

3.1.1.2. Charakterisierung der aus Mitochondrienfraktionen isolierbaren Ribosomen durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Die in Tabelle 1 beschriebenen Mitochondrienpräparationen wurden in AMT (100 mM NH_4Cl , 10 mM $MgCl_2$, 30 mM Tris-HCl, pH 7,5) suspendiert und mit Triton X-100 lysiert. Aus dem Lysat wurden die Ribosomen pelletiert und anschließend durch Zentrifugation über einen konvexen Saccharose-Dichtegradienten ihre Zusammensetzung aus Monosomen, Polysomen und Untereinheiten analysiert. Die cytoplasmatischen Ribosomen wurden aus den postmitochondrialen Überständen der SAMT-Präparationen gewonnen (Einzelheiten siehe 4.3.).

In Abb. 1 ist eine vergleichende Dichtegradienten-Zentrifugation von cytoplasmatischen und den in verschiedenen isolierten Mitochondrien enthaltenen Ribosomen dargestellt. Die verwendeten Sedimentationskonstanten für die cytoplasmatischen Ribosomen (79-S für das Monosom, 60-S für die große und 37-S für die kleine Untereinheit) und die in EDTA-Mitochondrien enthaltenen mitochondrialen Ribosomen (73-S für das Monosom, 50-S für die große und 37-S für die kleine Untereinheit) wurden durch Kozentrifugation von ^3H -markierten E. coli Ribosomen ermittelt und stimmen weitgehend mit den von Küntzel und Noll angegebenen Werten überein (70).

Wenn die Mitochondrien mit EDTA-haltigem Medium isoliert werden (1,0 mM oder 0,1 mM EDTA), zeigt das Absorptionsprofil des Gradienten einen prominenten Gipfel, der dem mitochondrialen 73-S Monosom entspricht, weiterhin im niedrigeren Dichtebereich zwei kleinere Gipfel, entsprechend der großen (50-S) und kleinen Untereinheit (37-S). Im Bereich höherer Dichte finden sich weitere Gipfel, die dem mitochondrialen Disom (109-S) und Trisom entsprechen (Abb. 1 A und D). Die cytoplasmatischen Monosomen zeigen mit 79-S eine deutlich tiefer gelegene Position im Gradienten.

Werden die Mitochondrien in Gegenwart von 10 mM Mg-Ionen an Stelle von EDTA präpariert, so zeigt sich ein deutlich verändertes Bild (Abb. 1 B). Der Hauptgipfel ist mit 79-S identisch mit dem cytoplasmatischen Monosom. Der kleinere Gipfel in Position 73-S entspricht dem von Küntzel und Noll (70) beschriebenen mitochondrialen Monosom. In Position 50-S und 37-S finden sich zwei Gipfel, die den mitochondrialen Untereinheiten entsprechen. Weiterhin können im Polysomen-Bereich deutlich Di- und Trisomen mit den für mitochondriale und cytoplasmatische Ribosomen charakteristischen S-Werten unterschieden werden.

Werden die Mitochondrien in Mg-haltigem Medium (Medium B) isoliert, aber zweimal mit EDTA-haltigem Medium (Medium A) gewaschen, so verändert sich das Absorptionsprofil zugunsten der mitochondrialen Ribosomen (Abb. 1 C).

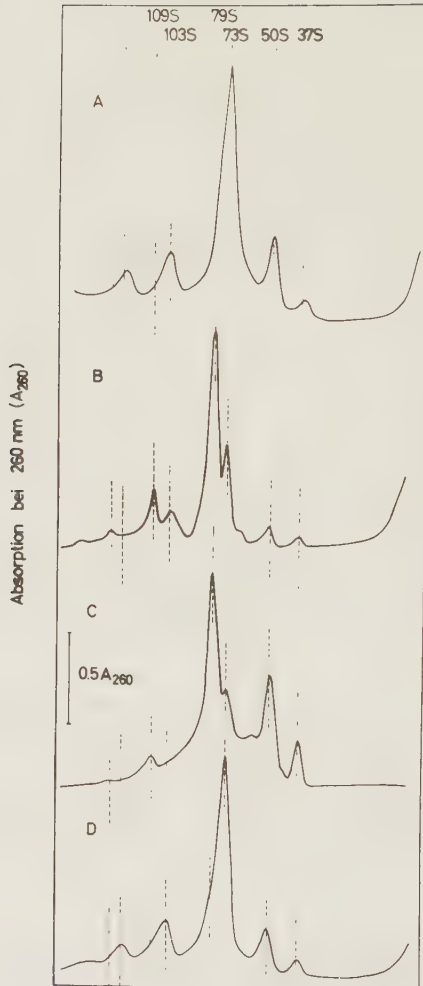


Abb. 1 Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen aus Mitochondrienfraktionen, die unter verschiedenen Isolierungsbedingungen präpariert wurden.

Bezeichnung der Mitochondrien und Isolierungsbedingungen siehe Tabelle 1.

A: Ribosomen aus $SE_{1,0}^T$ -Mitochondrien; B: Ribosomen aus $SAMT$ -Mitochondrien; C: Ribosomen aus SME -Mitochondrien; D: Ribosomen aus $SE_{0,1}^T$ -Mitochondrien.

Diese Befunde lassen sich folgendermaßen erklären: Isoliert man Mitochondrien in EDTA-haltigem Medium, so werden alle dem EDTA zugänglichen extramitochondrialen Ribosomen dissoziiert und von Membranen abgelöst. Man bekommt somit eine saubere Präparation mitochondrialer Ribosomen. Isoliert man die Mitochondrien dagegen in Gegenwart von 10 mM Mg-Ionen, so bleiben die extramitochondrialen Ribosomen und ihre Bindung an Membranen intakt. Der in Tabelle 1 gezeigte Anstieg des Ribosomengehalts von SAMT-Mitochondrien um den Faktor 3 - 4 im Vergleich zu EDTA-Mitochondrien deckt sich mit dem Bild des Absorptionsprofils der aus SAMT-Mitochondrien isolierten Ribosomen. Man erkennt, daß in Gegenwart von Mg-Ionen zusätzlich zu den mitochondrialen Ribosomen 2- bis 3mal so viele cytoplasmatische Ribosomen in die Mitochondrienfraktion gelangen.

Zur Absicherung der in Abb. 1 gezeigten Identität der Sedimentationskonstante des cytoplasmatischen Monosoms mit der Sedimentationskonstante des prominenten Gipfels im SAMT-Gradienten wurde folgendes Experiment durchgeführt: Ribosomen von SAMT-Mitochondrien wurden aus Hyphen isoliert, denen in der logarithmischen Wachstumsphase ^3H -Leucin zur homogenen Markierung des Proteins angeboten wurde (Einbauzeit: 2 h). In gleicher Weise präparierte ^{14}C -Leucin markierte cytosolische Ribosomen wurden gemeinsam mit den ^3H -Leucin markierten SAMT-Ribosomen durch einen Dichtegradienten zentrifugiert. Der Gradient wurde in 60 Fraktionen zerlegt und die Verteilung der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität bestimmt (Abb. 2).

In der Verteilung der ^3H -Aktivität erkennt man ebenfalls den für Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien charakteristischen prominenten 79-S Gipfel mit einer 73-S Schulter. Die ^{14}C -Aktivität des Monosoms der kozenrifugierten cytoplasmatischen Ribosomen zeigt wiederum eindeutig identisches Sedimentationsverhalten mit dem prominenten Monosom aus SAMT-Mitochondrien.

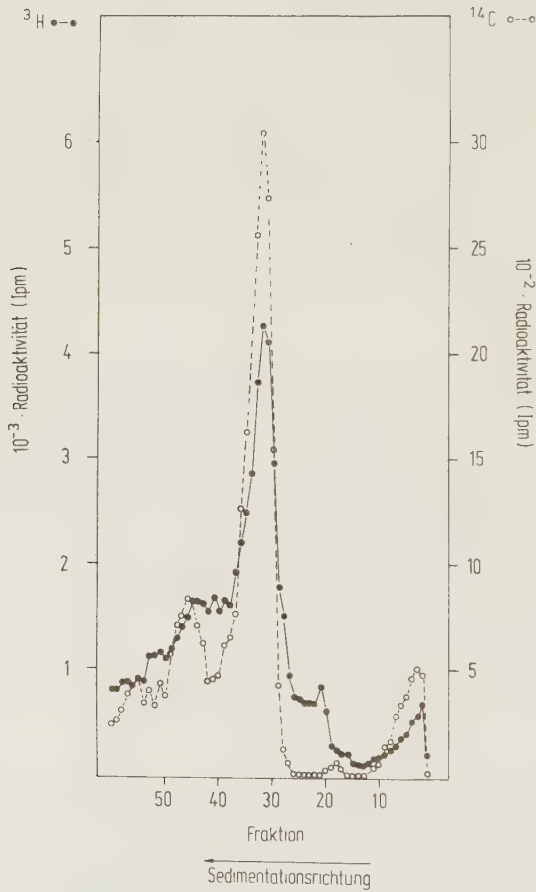


Abb. 2 Verteilung der Radioaktivität in einem Saccharose-Dichtegradienten nach Kozenrifugation von ^3H -markierten Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien und ^{14}C -markierten cytoplasmatischen Ribosomen.

- ——— •: Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien (^3H)
- ° - - - - °: Cytoplasmatische Ribosomen (^{14}C)

3.1.1.3. Wirkung von Heparin auf das Sedimentations-Verhalten der Ribosomen im Dichtegradienten

Heparin wird häufig zur Isolierung von Ribosomen verwendet, um die Polysomen vor einem Zerfall in Monosomen und Untereinheiten zu schützen. Heparin wirkt dabei als Nukleasen-Inhibitor und vermindert so eine Fraktionierung der messenger-RNS.

Werden cytoplasmatische Ribosomen und Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien in Gegenwart von 0,5 mg Heparin/ml isoliert, so zeigt sich ein erhebliches Ansteigen des Polysomenanteils zu Lasten des Monosoms (Abb. 3). Auffallend ist das Verschwinden der 73-S Komponente in den Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien und das gleichzeitige Auftreten von Untereinheiten mit Sedimentationskonstanten von 50-S und 37-S. Eine Erklärung hierfür liefert der in Abb. 3 dargestellte weitgehende Zerfall der aus $SE_{1,0}T$ -Mitochondrien isolierten mitochondrialen Ribosomen in ihre Untereinheiten.

Das alleinige Auftreten des Monosoms mit einem S-Wert von etwa 79 in Ribosomen von Mitochondrien, die in Gegenwart von Mg-Ionen und Heparin isoliert werden können, wird von Datema et al. (63) dahingehend interpretiert, daß zur Isolierung von intakten mitochondrialen Ribosomen aus *Neurospora crassa* die Gegenwart von Mg-Ionen und Heparin erforderlich ist. Dem nativen mitochondrialen Monosom wird eine Sedimentationskonstante von 80-S zugeschrieben. Das ohne Heparin auftretende 73-S Monosom wird als Isolierungsartefakt betrachtet. Demgegenüber gibt die in Abb. 3 gezeigte Labilität der mitochondrialen Ribosomen gegenüber Heparin eine einfache Erklärung für die alleinige Anwesenheit von 77 - 81-S Ribosomen in Mitochondrien, die mit Mg-Ionen und Heparin isoliert wurden.

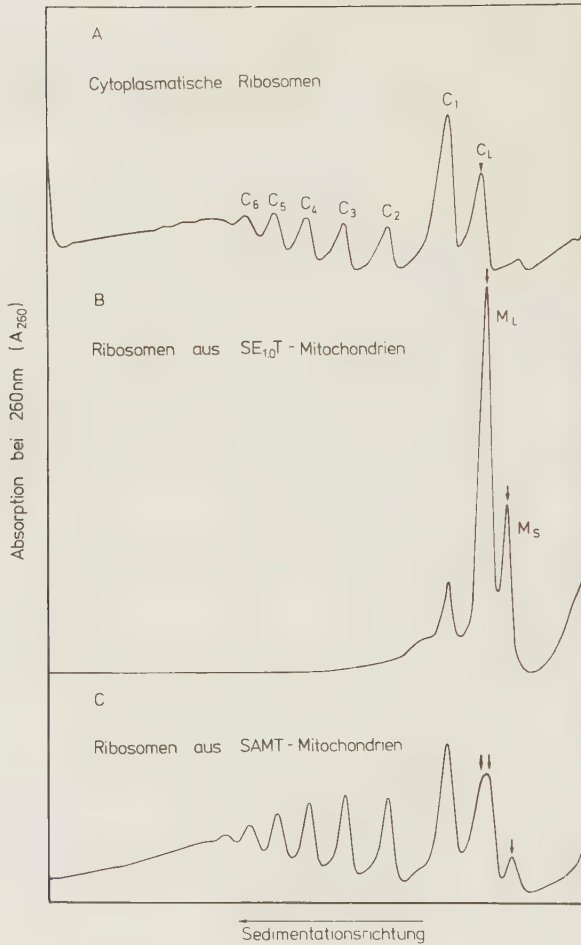


Abb. 3 Dichtegradienten-Profile von Ribosomen, die in Gegenwart von Heparin isoliert wurden (0,5 mg/ml Isolierungsmedium).

A: Cytoplasmatische Ribosomen

B: Ribosomen aus $SE_{1,0}T$ -Mitochondrien

C: Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien

C_L , C_1 - C_6 : cytoplasmatische große Untereinheit, cytoplasmatische Mono- und Polysomen

M_L , M_S : mitochondriale große und kleine Untereinheit

3.1.1.4. Untersuchung der ribosomalen RNS-Spezies von Mitochondrienfraktionen nach Aufschluß der Zellen in verschiedenen Isolierungsmedien

Zur weiteren Charakterisierung der aus Mitochondrien-Präparationen isolierbaren Ribosomen wurden ihre RNS mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (siehe 4.3.7.). Die RNS wurden durch Lysieren und Phenolisieren der Mitochondrienpräparationen und anschließende Präzipitation mit Äthanol gewonnen. In Abb. 4 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der hochmolekularen RNS aus den verschiedenen Mitochondrienpräparationen (siehe Tabelle 1) und aus dem postmitochondrialen Überstand dargestellt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden die in ihrer Größe bekannten ribosomalen RNS von *E. coli* auf allen Gelen mit aufgetrennt.

Sowohl die RNS aus den $SE_{1,0}T$ -Mitochondrien als auch aus dem postmitochondrialen Überstand werden jeweils in zwei hochmolekulare Banden aufgetrennt (Abb. 4 A und D). Die Banden mit jeweils geringerer elektrophoretischer Beweglichkeit, entsprechend den RNS der großen ribosomalen Untereinheiten, unterscheiden sich ebenso wie die RNS der kleinen ribosomalen Untereinheiten deutlich in ihren scheinbaren Molekulargewichten. Der kleine Doppelpeak nahe am Auftrag des Gels der $SE_{1,0}T$ -Mitochondrien stellt DNS dar und hier wahrscheinlich die mitochondriale DNS; in den RNS aus dem postmitochondrialen Überstand ist dieser Peak nicht vorhanden.

Das RNS-Profil der SAMT-Mitochondrien zeigt neben einem extrem hohen DNS-Gehalt vier deutlich aufgetrennte RNS-Spezies, deren scheinbare Molekulargewichte identisch sind mit den RNS der mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomenuntereinheiten (Abb. 4 B). In Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.1.1.2. beschriebenen Befunden wird auch hier ein Überwiegen der cytoplasmatischen Komponenten sichtbar. Die Analyse von Mitochondrien, die in SAMT isoliert, aber zweimal mit $SE_{1,0}T$ -Medium gewaschen wurden (Abb. 4 C), zeigt eine deutliche Abnahme des Gehalts an cytoplasmatischen RNS-Spezies. In diesem Falle dominieren die RNS der mitochondrialen Ribosomen.

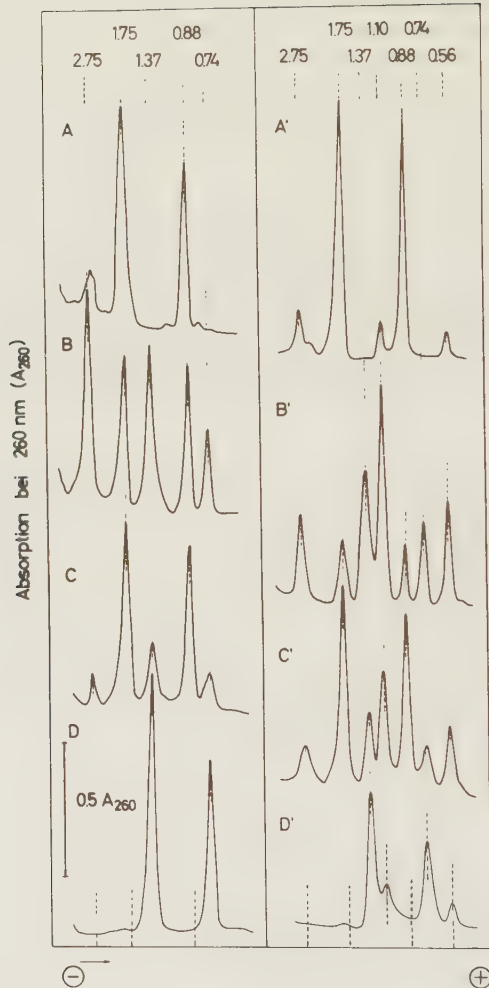


Abb. 4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der hochmolekularen RNS aus Mitochondrien und aus dem postmitochondrialen Überstand.

A: SE₁₀-Mitochondrien; B: SAMT-Mitochondrien,
C: SME-Mitochondrien; D: postmitochondrialer Überstand;

Die scheinbaren Molekulargewichte wurden durch Koelektrophorese von ribosomaler RNS aus *E. coli* bestimmt (A', B', C', D'). Die Gele wurden bei 25 - 30° C elektrophoretisiert. Die scheinbaren Molekulargewichte $\times 10^{-6}$ sind im Bild oben angegeben.

Das höhere scheinbare Molekulargewicht der mitochondrialen ribosomalen RNS ist auf die Durchführung der Elektrophorese bei 25° C zurückzuführen. Es ist bekannt, daß die elektrophoretische Beweglichkeit von mitochondrialen RNS-Spezies stark von der Temperatur während der Elektrophorese abhängt (76 - 80). Dies beruht auf der Tatsache, daß die mitochondrialen RNS-Spezies von *Neurospora* wie alle mitochondrialen ribosomalen RNS einen niedrigen G + C-Anteil besitzen. Das Aufschmelzen von Basenpaaren in mitochondrialen RNS erfolgt deshalb bereits bei einer Temperatur, bei der die cytoplasmatischen ribosomalen RNS diesen Effekt noch nicht zeigen. Die Bestimmung der Molekulargewichte der mitochondrialen ribosomalen RNS durch Elektrophorese liefert wegen der niedrigeren Wanderungsgeschwindigkeit der entfalteten Moleküle zu hohe Werte. Die Elektrophorese bei 4° C, einer Temperatur, bei der auch die mitochondriale RNS nativ vorliegt, ergab eine unvollständige Auftrennung der Banden. Dies ist auf die geringen Unterschiede der cytosolischen und mitochondrialen ribosomalen RNS zurückzuführen. Alle Gele wurden deshalb bei 25° C elektrophoretisiert.

Ein weiteres Indiz für das Vorkommen von cytoplasmatischen Ribosomen in SAMT-Mitochondrien liefert die elektrophoretische Analyse der niedermolekularen ribosomalen RNS. Hierzu wurden die RNS-Extrakte auf 7,5 %igen Gelen aufgetrennt (Abb. 5). Abb. 5 A zeigt das Absorptionsprofil von cytoplasmatischen Ribosomen mit einer 5-S Komponente. Werden die RNS-Extrakte 10 min bei 65° C erwärmt, anschließend auf 0° C abgekühlt und analysiert, so erhält man eine weitere Komponente von 5,8-S (Abb. 5 A'). Die Anwesenheit einer nicht-kovalent gebundenen 5,8-S RNS ist für cytoplasmatische Ribosomen von Säugern und höheren Pflanzen beschrieben worden (29, 81 - 84). Eine solche Abspaltung einer niedermolekularen Komponente aus der hochmolekularen ribosomalen RNS wurde bei mitochondrialen Ribosomen nicht beobachtet (Abb. 5 C und C'). Nach Erwärmen und Abkühlen der extrahierten RNS findet sich neben der 4-S RNS keine weitere Komponente. Somit kann das Auftreten der 5,8-S RNS zur Identifizierung von cytoplasmatischen Ribosomen herangezogen werden.

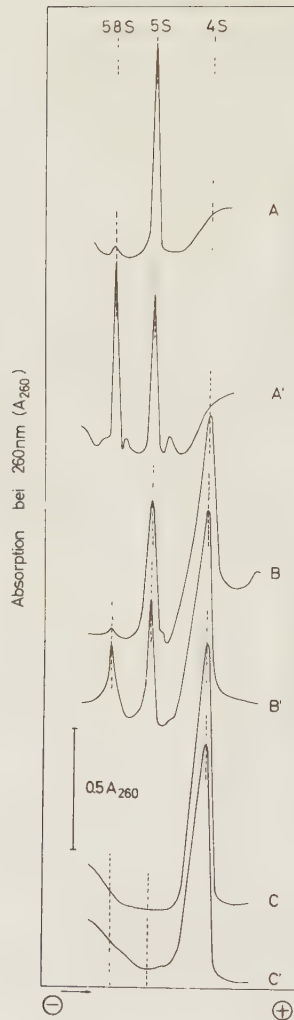


Abb. 5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der niedermolekularen RNS aus Mitochondrien und aus dem postmitochondrialen Überstand.

A: postmitochondrialer Überstand; B: SAMT-Mitochondrien;

C: $SE_{1,0}^T$ -Mitochondrien;

In A', B', C' wurden die RNS-Extrakte vor der Elektrophorese zusätzlich 10 min bei 65° C erwärmt und anschließend auf 0° C abgekühlt.

Die Elektrophorese der RNS-Extrakte aus SAMT-Mitochondrien liefert zwei Banden, die den mitochondrialen (4-S) und cytoplasmatischen (5-S) RNS entsprechen (Abb. 5 B). Nach Erwärmen und Abkühlen tritt der für cytoplasmatische Ribosomen charakteristische 5,8-S Peak in Erscheinung (Abb. 5 B').

3.1.1.5. Immunologische Identifizierung der in Mitochondrienfraktionen enthaltenen Ribosomen

Ein anderes methodisches Vorgehen zum spezifischen Nachweis von mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomen wurde durch Anwendung immunologischer Methoden gewählt. Für E. coli Ribosomen konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen gesamte Ribosomen mit den einzelnen Ribosomenproteinen reagieren (85). Die immunologischen Eigenschaften von cytoplasmatischen verglichen mit mitochondrialen Ribosomen sind bisher noch nicht beschrieben worden.

Antikörper gegen die cytoplasmatischen (c-Ribosomen) und mitochondrialen Ribosomen (m-Ribosomen, aus SE_{1,0}T-Mitochondrien) wurden durch viermalige Injektion von Ribosomensuspensionen in Kaninchen gewonnen (siehe experimenteller Teil). Die Titrationskurven in Abb. 6 zeigen eine vollständige Immunpräzipitation von c-Ribosomen durch Antiserum gegen c-Ribosomen und von m-Ribosomen durch Antiserum gegen m-Ribosomen. Antikörper gegen m-Ribosomen reagieren nicht mit c-Ribosomen. Umgekehrt fällt Antiserum gegen c-Ribosomen etwa 11 % der m-Ribosomen-Präparation. Kontrollserum aus nicht immunisierten Kaninchen fällt aus c-Ribosomen nur 1,5 %, aus m-Ribosomen dagegen ca. 5 %. In Tabelle 3 sind die jeweils maximal präzipitierbaren Ribosomenmengen zusammengestellt.

Der relativ hohe unspezifische Anteil von 5 % kann durch die bekannte höhere Aggregationsneigung der m-Ribosomen erklärt werden (86, 87). Nach Abzug der unspezifischen Fällung aus m-Ribosomen durch Antikörper gegen c-Ribosomen verbleibt ein spezifischer Anteil von 6 %. Dies kann bedeuten, daß das Antiserum gegen c-Ribosomen auch m-Ribosomen erkennt, also kreuzreagiert, oder aber, daß die m-Ribosomen zu 6 % durch c-Ribosomen kontaminiert sind. Um dies zu prüfen, wurden homogen mit ³H-Leucin markierte

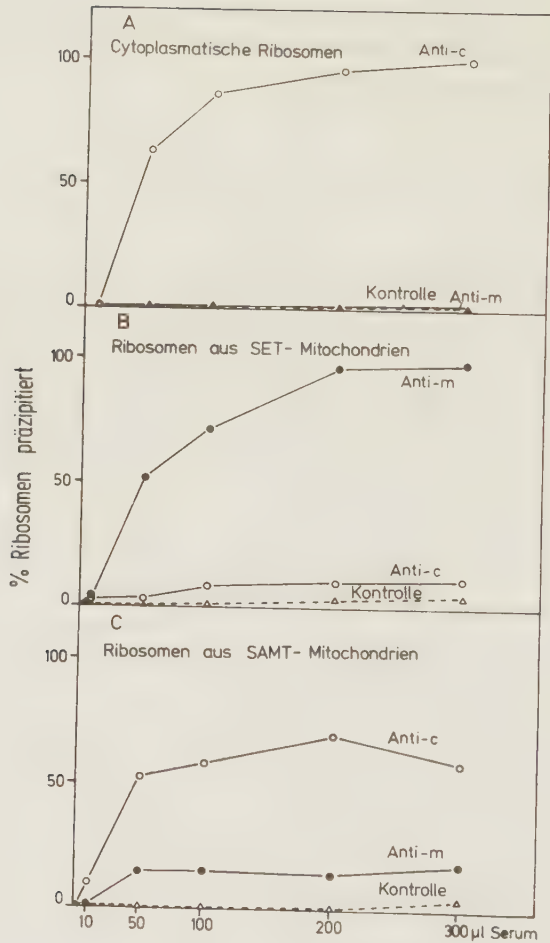


Abb. 6

Quantitative Immunpräzipitation von cytoplasmatischen Ribosomen und Ribosomen aus SET- und SAMT-Mitochondrien.

A: Cytoplasmatische Ribosomen;

B: Ribosomen aus SET-Mitochondrien (SET: 0,44 M Saccharose, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6);

C: Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien (SAMT: 0,44 M Saccharose, 0,1 M NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 30 mM Tris-HCl, pH 7,6)

Tabelle 3 Immunpräzipitation von Ribosomen mit Antiseren gegen mitochondriale und cytoplasmatische Ribosomen.

Die Ansätze enthielten 0,3 ml Antiserum, 2 OD₂₆₀ Ribosomen (³H-markiert), 1 % Triton X-100/AMT. Endvolumen: 1,5 ml.

SET: 0,44 M Saccharose, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6.

SAMT: 0,44 M Saccharose, 0,1 M NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6.

Anti-c: Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen

Anti-m: Antiserum gegen mitochondriale Ribosomen

Kontrolle: Serum von nichtimmunisierten Kaninchen

Ribosomen aus	Antiserum	% Ribosomen präzipitiert
Cytoplasma	Anti-c	99,8
	Anti-m	1,6
	Kontrolle	1,5
SET-Mitochondrien	Anti-c	10,8
	Anti-m	97,7
	Kontrolle	4,7
SAMT-Mitochondrien	Anti-c	70,1
	Anti-m	18,2
	Kontrolle	5,0
E. coli	Anti-c	0,2
	Anti-m	0,3
	Kontrolle	0,3

m-Ribosomen (aus SE_{1,0}T-Mitochondrien) durch einen Dichtegradienten zentrifugiert. Abb. 7 zeigt das entsprechende Absorptionsprofil der m-Ribosomen (Abb. 7 A) verglichen mit dem von c-Ribosomen (Abb. 7 C) und einem Gemisch aus beiden Ribosomenarten (Abb. 7 B).

Der m-Ribosomen-Gradient wurde in 30 Fraktionen zerlegt und das

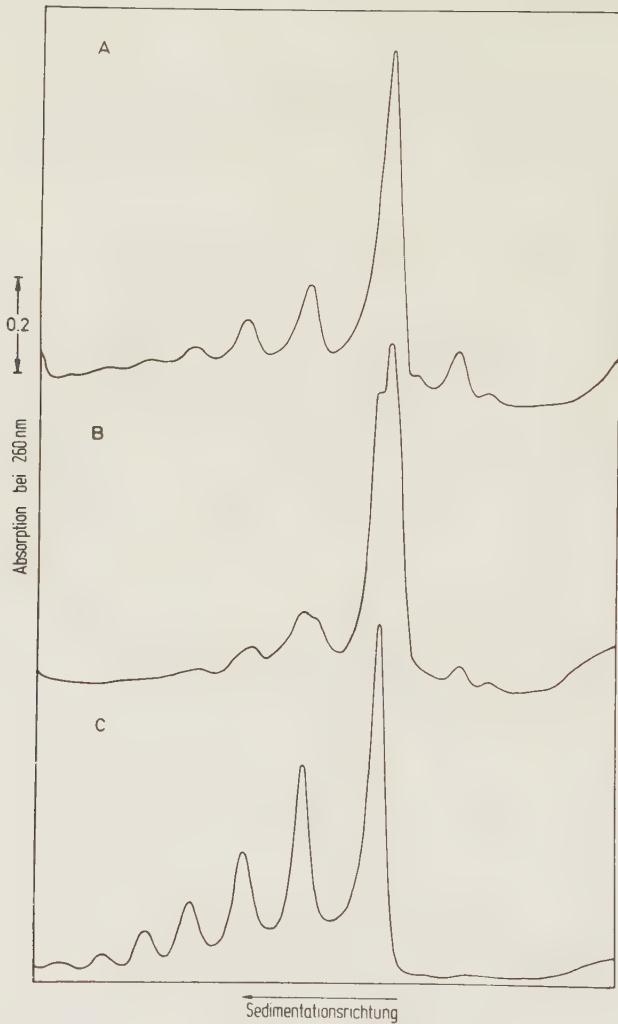


Abb. 7 Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation von mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomen.

- A: mitochondriale Ribosomen;
- B: mitochondriale + cytoplasmatische Ribosomen;
- C: cytoplasmatische Ribosomen;

Radioaktivitätsprofil ermittelt (Abb. 8 A). Der Gipfel bei Fraktion 12 - 13 entspricht dem mitochondrialen 73-S Monosom. Zum Nachweis von eventuell vorhandenen kleinen Verunreinigungen durch c-Ribosomen reicht das Auflösungsvermögen des Gradienten nicht aus. Deshalb wurde aus allen Fraktionen erst mit Antiserum gegen c-Ribosomen präzipitiert und die Überstände anschließend mit Antiserum gegen m-Ribosomen inkubiert. Die Radioaktivitätsverteilung der Präzipitate ist in Abb. 8 B und C dargestellt (experimentelle Einzelheiten siehe 4.3.6.).

Das mit Antiserum gegen m-Ribosomen erhaltene Aktivitätsprofil deckt sich weitgehend mit der in Abb. 8 A dargestellten Radioaktivitätsverteilung des Gradienten vor Zugabe von Antiserum. Durch Präzipitation mit Antiserum gegen c-Ribosomen dagegen erhält man in Fraktion 14 - 15 einen Gipfel, der dem cytoplasmatischen Monosom (79-S) entspricht, einen weiteren in Fraktion 11, der mit einer Sedimentationskonstante von ca. 60-S der cytoplasmatischen großen Untereinheit zugeschrieben werden kann. Die Summe der mit Antikörpern gegen c-Ribosomen präzipitierbaren Radioaktivität entspricht 5 % der auf den Gradienten aufgetragenen Radioaktivität. Dies stimmt mit den in Tabelle 3 gezeigten Daten überein. Durch direkte Präzipitation aus einer Präparation von m-Ribosomen mit Antiserum gegen c-Ribosomen wurden nach Abzug der unspezifisch gefällten Radioaktivität mit Kontrollserum ebenfalls 5 - 6 % der gesamten Ribosomen ausgefällt.

Die in Tabelle 3 und Abb. 8 dargelegten Befunde lassen klar erkennen:

1. Antikörper gegen cytoplasmatische Ribosomen reagieren nicht mit mitochondrialen Ribosomen und umgekehrt, Antikörper gegen mitochondriale Ribosomen reagieren nicht mit cytoplasmatischen Ribosomen.
2. Die aus dreimal gewaschenen $SE_{1,0}T$ -Mitochondrien isolierten mitochondrialen Ribosomen sind zu etwa 5 - 6 % mit cytoplasmatischen Ribosomen verunreinigt. Offenbar wird durch Immunisierung mit dieser verunreinigten Ribosomen-Präparation ein Antiserum erhalten, dessen Titer gegen die Verunreinigung unbedeutend ist.

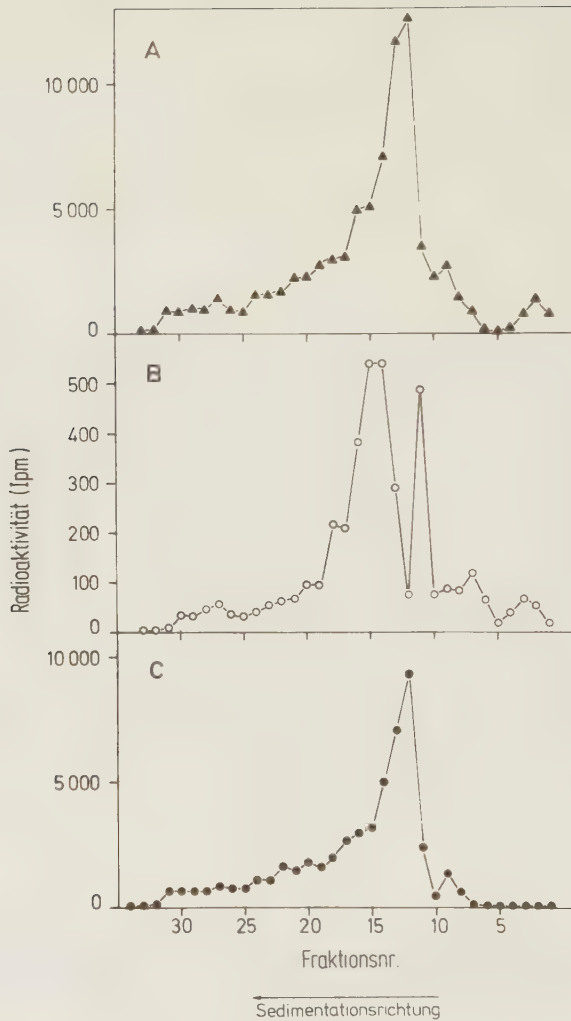


Abb. 8 Immunpräzipitation von ^3H -markierten Ribosomen aus SET-Mitochondrien nach Zentrifugation durch einen Saccharosedichtegradienten.

A: Verteilung der Radioaktivität im Gradienten vor Zugabe der Antiseren;

B: mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen präzipitierte Radioaktivität;

C: mit Antiserum gegen mitochondriale Ribosomen präzipitierte Radioaktivität;

3. Antikörper gegen cytoplasmatische und mitochondriale Ribosomen zeigen auch gegen E. coli-Ribosomen keine spezifische Reaktion.

Somit konnten die hergestellten Antikörper zur Identifizierung der in SAMT-Mitochondrien enthaltenen Ribosomen eingesetzt werden. Wie aus Tabelle 3 und Abb. 6 C ersichtlich, können 70 - 80 % der Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen präzipitiert werden. Mit Antiserum gegen mitochondriale Ribosomen läßt sich deren Anteil mit ca. 15 - 20 % bestimmen.

Zur immunologischen Identifizierung des in Abb. 1 beschriebenen prominenten 79-S Gipfels aus SAMT-Mitochondrien wurden homogen mit ^3H -Leucin markierte SAMT-Ribosomen auf einem Gradienten aufgetrennt. Abb. 9 A gibt die entsprechende Radioaktivitätsverteilung wieder. Die Gradientenfraktionen wurden geteilt und jeweils mit Antiserum gegen c-Ribosomen und unmarkierten Carrier-c-Ribosomen bzw. mit Antiserum gegen m-Ribosomen und unmarkierten Carrier-m-Ribosomen inkubiert. Die Verteilung der Radioaktivität in den Präzipitaten und deren Überständen sind in Abb. 9 B und C dargestellt.

Die Antikörper gegen c-Ribosomen präzipitieren das 79-S Monosom und das 109-S Dimere (Abb. 9 B); das 73-S Monosom, das 103-S Dimere und die 50-S Untereinheit verbleiben im Überstand (Abb. 9 C). Umgekehrt führt die Inkubation mit Antiserum gegen m-Ribosomen zur Präzipitation des 73-S Monosoms, des 103-S Dimeren und der 50-S Untereinheit (Abb. 9 B), während in diesem Falle das 79-S Monosom im Überstand gefunden wird (Abb. 9 C).

Einen weiteren Hinweis für die Anwesenheit von c-Ribosomen in SMT-Mitochondrien liefert die Inkubation von SET- und SMT-Mitochondrien mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen und die elektronenmikroskopische Untersuchung des Inkubationsansatzes. Für diese Experimente wurde ein Mg-haltiges Medium ohne NH_4Cl verwendet (SMT: 0,44 M Saccharose, 10 mM MgCl_2 , 30 mM Tris-HCl, pH 7,5). Abb. 10 zeigt die Inkubationsansätze nach 2 h bei 0° C. SMT-Mitochondrien zeigen mit Antiserum gegen c-Ribosomen eine deutliche Agglutination, während durch Inkubation mit Kontrollserum die Mitochondriensuspension unverändert bleibt.

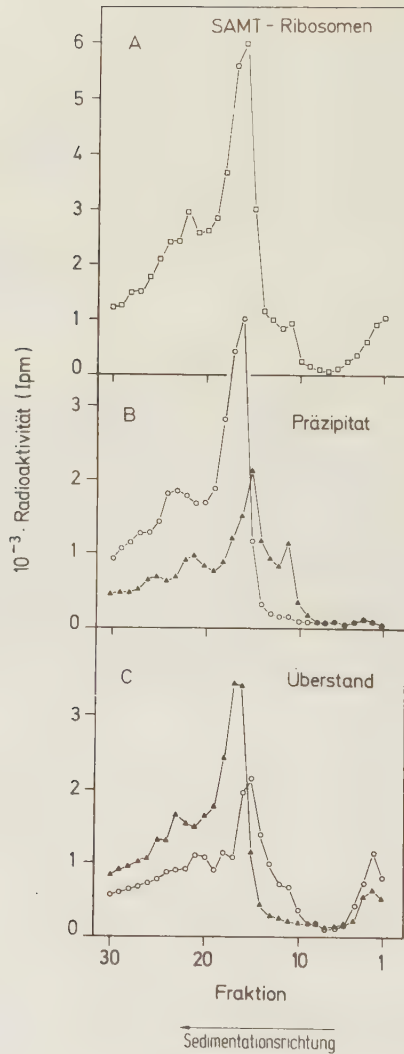


Abb. 9 Immunpräzipitation von ^3H -markierten Ribosomen aus SAMT-Mitochondrien nach Zentrifugation durch einen Saccharosedichtegradienten.

- A: Verteilung der Radioaktivität im Gradienten vor Zugabe der Antiseren;
 B: ○ — ○: mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen präzipitierte Radioaktivität;
 ▲ — ▲: mit Antiserum gegen mitochondriale Ribosomen präzipitierte Radioaktivität;
 C: ○ — ○: Radioaktivität im Überstand nach Präzipitation mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen;
 ▲ — ▲: Radioaktivität im Überstand nach Präzipitation mit Antiserum gegen mitochondriale Ribosomen;

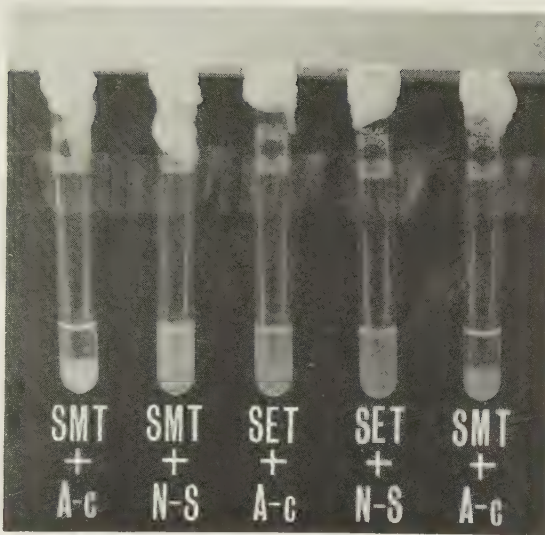


Abb. 10 Behandlung von SMT- und SET-Mitochondrien mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen.

SMT + A-c: Mitochondrien, isoliert und 1 x gewaschen in SMT-Medium + Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen;

SMT + N-S: Mitochondrien, isoliert und 1 x gewaschen in SMT-Medium + Serum von einem nichtimmunisierten Kaninchen;

SET + A-c: Mitochondrien, isoliert in SET-Medium und 1 x in SMT-Medium gewaschen + Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen;

SET + N-S: Mitochondrien, isoliert in SET-Medium und 1 x in SMT-Medium gewaschen + Serum von einem nichtimmunisierten Kaninchen;

SMT: 0,44 M Saccharose, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6;

SET: 0,44 M Saccharose, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6;

Inkubation siehe Tabelle 4.

Die SET-Mitochondrien dagegen können weder mit Antiserum gegen c-Ribosomen noch durch Kontrollserum präzipitiert werden.

Zur Quantifizierung des präzipitierten Materials wurde vorsichtig zentrifugiert, um ein Sedimentieren der Mitochondrien möglichst zu vermeiden. In Tabelle 4 sind die prozentualen Anteile des gefällten Materials aus ^3H -Leucin markierten SMT- und ^{14}C -Leucin markierten SET-Mitochondrien zusammengestellt. Antiserum gegen c-Ribosomen fällt 64 % der eingesetzten ^3H -markierten SMT-Präparation, Kontrollserum dagegen nur 0,8 %. Aus ^{14}C -markierten SET-Mitochondrien wird mit Antiserum gegen c-Ribosomen und mit Kontrollserum in gleicher Weise ein unspezifischer Anteil von 11 - 13 % sedimentiert. Werden schließlich die ^3H -SMT-Mitochondrien und die ^{14}C -SET-Mitochondrien gemischt und mit Antiserum gegen c-Ribosomen bzw. Kontrollserum inkubiert, so findet sich im Niederschlag wieder eine unspezifische Sedimentation der ^{14}C -markierten SET-Mitochondrien; das ^3H -markierte SMT-Material wird dagegen auch aus dem Gemisch weitgehend spezifisch ausgefällt.

Diese Ergebnisse könnten so interpretiert werden, daß an der mitochondrialen Außenmembran gebundene c-Ribosomen zu einer Agglutination der Mitochondrien führen oder daß rauhes endoplasmatisches Retikulum in direktem Kontakt mit der mitochondrialen Außenmembran steht und so eine spezifische Mitfällung bewirkt. Weiterhin muß eine unspezifische Mitfällung insbesondere der SMT-Mitochondrien durch Aggregation mit ribosomenbesetzten Mikrosomenvesikeln in Gegenwart von Mg-Ionen in Betracht gezogen werden.

Hinweise für eine solche Interpretation liefern die in Abb. 11 A und B dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Inkubationsansätze. Die SET-Mitochondrien weisen eine weitgehend intakte Struktur auf. Außer den intramitochondrialen Ribosomen sind keine Ribosomen außerhalb der Mitochondrien zu erkennen. Die SMT-Mitochondrien weisen überwiegend zerstörte mitochondriale Strukturen auf. Daneben finden sich viele mit Ribosomen besetzte Vesikel, die, bedingt durch das Antiserum gegen die cytoplasmatischen Ribosomen, deutliche Verklumpungen erkennen lassen. Die Präzipitation von Mitochondrien kommt also nicht durch eine direkte Agglutination der Mitochondrien über an die Außen-

Tabelle 4 Quantitative Bestimmung der Agglutination von Mitochondrienfraktionen mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen.

Die Ansätze enthielten 1 mg ^3H -markierte SMT-Mitochondrien oder/und 1 mg ^{14}C -markierte SET-Mitochondrien in 1 ml SMT-Medium + 0,1 ml Antiserum oder Serum von einem nichtimmunisierten Kaninchen. Inkubation: 2 h bei 0°C .

Die Radioaktivität im agglutinierten Material ist in % der eingesetzten Radioaktivität ausgedrückt.

% der agglutinierten Mitochondrien

Mitochondrien	Anti - c	NS
SMT (^3H)	64.0	0.8
SET (^{14}C)	12.5	11.6
SMT (^3H) + SET (^{14}C)	62.4 19.7	6.4 13.3

Anti - c : γ -Globulin gegen c-Ribosomen

NS : γ -Globulin von einem nicht-immunisierten
Kaninchen

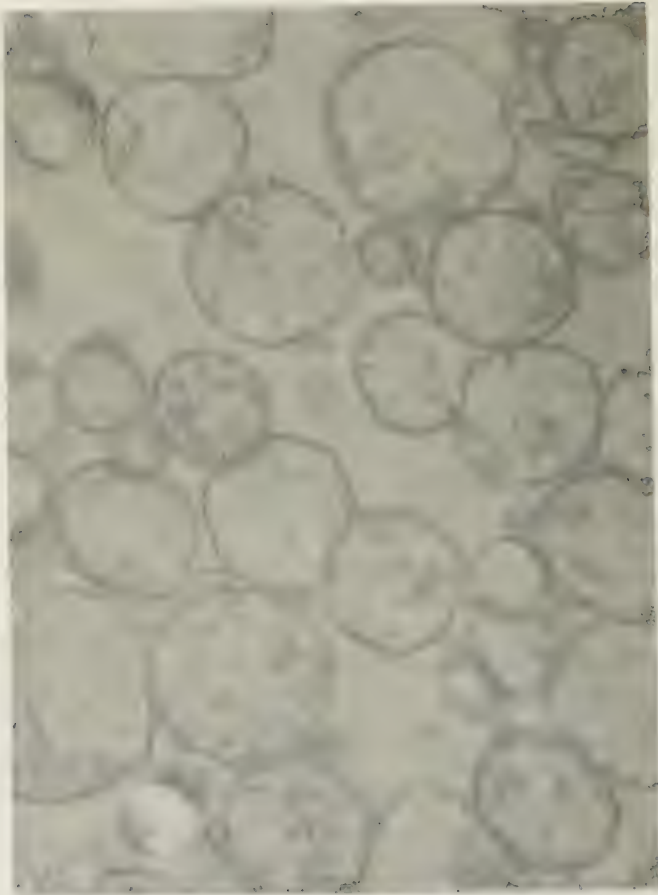


Abb. 11 A Elektronenmikroskopische Aufnahme von SET-Mitochondrien nach Inkubation mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen (x 50 000). Inkubation siehe Tabelle 4.

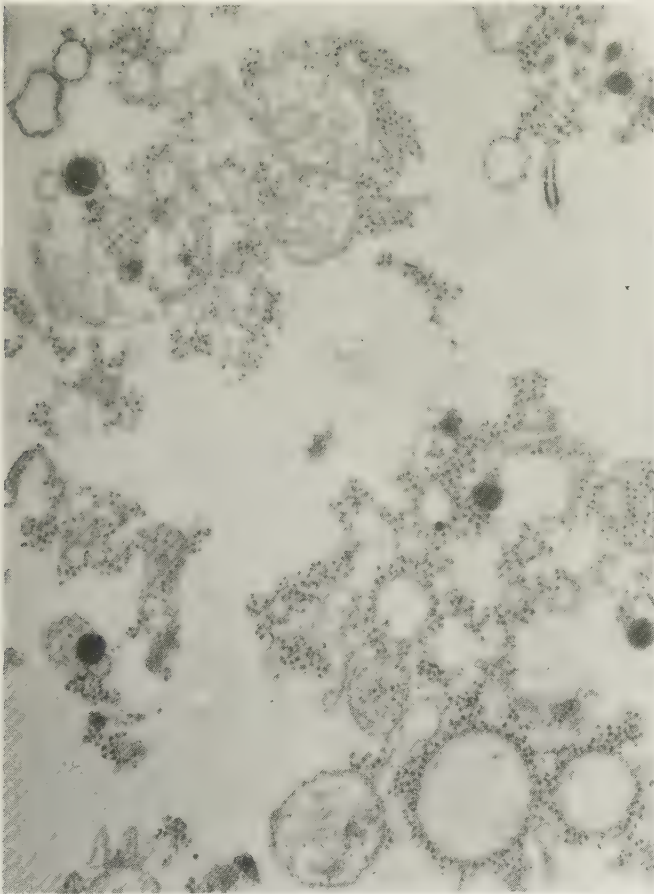


Abb. 11 B Elektronenmikroskopische Aufnahme von SMT-Mitochondrien nach Inkubation mit Antiserum gegen cytoplasmatische Ribosomen ($\times 50\,000$).

Inkubation siehe Tabelle 4.

membran gebundene Ribosomen zustande, sondern wahrscheinlich durch eine unspezifische Mitfällung. Die Zerstörung der mitochondrialen Strukturen wird dabei nicht durch Wechselwirkung mit den Antikörpern bedingt; SMT-Mitochondrien ohne Zusatz von Antiserum zeigen das gleiche Bild.

3.1.2. Identifizierung der Membranen der Mitochondrienfraktionen, die mit cytoplasmatischen Ribosomen besetzt sind: Charakterisierung einer Mikrosomenfraktion aus *Neurospora crassa*

Die in Kapitel 3.1.1. beschriebenen Untersuchungen liefern überzeugende Argumente für die Anwesenheit von membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen in Mitochondrienpräparationen, die in Mg-Ionen haltigem Medium isoliert wurden. Ihr Anteil übersteigt den Gehalt der mitochondrialen Ribosomen um das 3- bis 4fache.

Eine klare Aussage über die Herkunft der Membranen, die mit diesen cytoplasmatischen Ribosomen besetzt sind, kann auf Grund der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Mitochondrien-Präparationen nicht gemacht werden, da die Anwesenheit von Mg-Ionen bei der Isolierung zu schwerwiegenden Veränderungen der Membranstrukturen führt. Die in Abb. 11 B erkennbaren, mit Ribosomen besetzten Vesikel können von abgelösten mitochondrialen Außenmembranen, von kontaminierenden Vesikeln des rauen endoplasmatischen Retikulums oder von anderen Membranen der Zelle, die sich bei der Isolierung artefiziell mit Ribosomen assoziieren, herrühren.

3.1.2.1. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen

Die elektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts durch eine *Neurospora*-Hypho ist in Abb. 12 gezeigt. Die Zelle ist umgeben von einer dicken Zellwand. Neben dem Anschnitt des Zellkerns und mehreren Mitochondrien erkennt man deutlich Membranstrukturen, die sich nahezu über den gesamten Querschnitt der Zelle erstrecken.

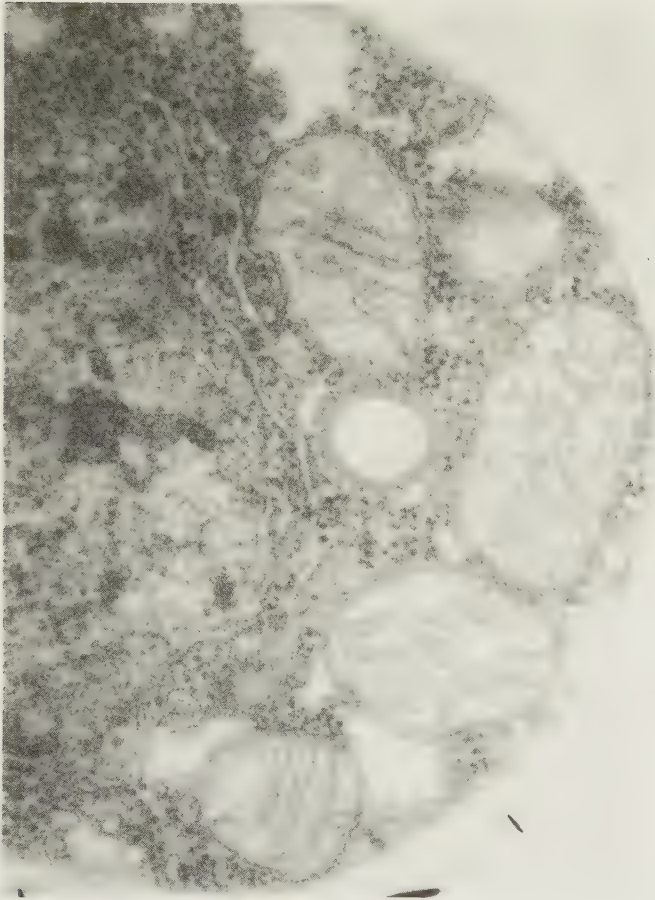


Abb. 12 Elektronenmikroskopischer Querschnitt durch eine Hyphe von *Neurospora crassa* (x 70 000).

Ein Vergleich dieser Strukturen mit dem aus höheren Eukaryonten bekannten endoplasmatischen Retikulum ist naheliegend. Im Cytoplasma befinden sich zahlreiche Ribosomen. Eine klare Unterscheidung zwischen freien und membrangebundenen Ribosomen ist daher nicht möglich.

Die bereits in Kapitel 3.1.1.5. erwähnte Zerstörung der mitochondrialen Strukturen durch Mg-Ionen machte es notwendig, Isolierungsbedingungen zu finden, die sowohl die Struktur der Mitochondrien als auch die Membranbindung von Ribosomen erhalten. Hierzu wurden Mitochondrien in Gegenwart unterschiedlicher Mg^{++} -Konzentrationen bzw. von EDTA präpariert und untersucht. Die verwendeten Hyphen waren 2 h lang mit ^{14}C -Leucin (zur Markierung des Gesamtproteins) und mit 3H -Uridin (zur Markierung der ribosomalen RNS) markiert worden. Sie wurden mit dem 5fachen Volumen des entsprechenden Isolierungsmediums aufgeschlossen.

Für die Isolierungen wurde ein Standardmedium (SAT: 0,5 M Saccharose, 5 mM NH_4Cl , 30 mM Tris, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 7,4) verwendet, dem EDTA bzw. verschiedene $MgCl_2$ -Mengen zugesetzt worden waren:

1. SAT + 10 mM EDTA,
2. SAT ohne Zusatz,
3. SAT + 0,5 mM $MgCl_2$,
4. SAT + 1,0 mM $MgCl_2$,
5. SAT + 2,0 mM $MgCl_2$,
6. SAT + 5,0 mM $MgCl_2$.

Die Mitochondrien wurden, wie in Abschnitt 4.2.2. beschrieben, sedimentiert und zweimal mit dem entsprechenden Medium gewaschen.

In Abb. 13 ist die Abhängigkeit des Ribosomengehalts der Mitochondrien-Präparationen (ausgedrückt durch das Verhältnis der 3H -Uridin- zur ^{14}C -Leucin-Markierung) von der Mg^{++} -Konzentration im Isolierungsmedium dargestellt. Isolierung mit EDTA bzw. ohne Mg^{++} ergibt annähernd gleiche Ribosomengehalte. Steigende Mg^{++} -Konzentrationen führen zu steigendem Gehalt an Ribosomen. In Abb. 14, 15 und 16 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einiger Mitochondrien-Präparationen dargestellt.

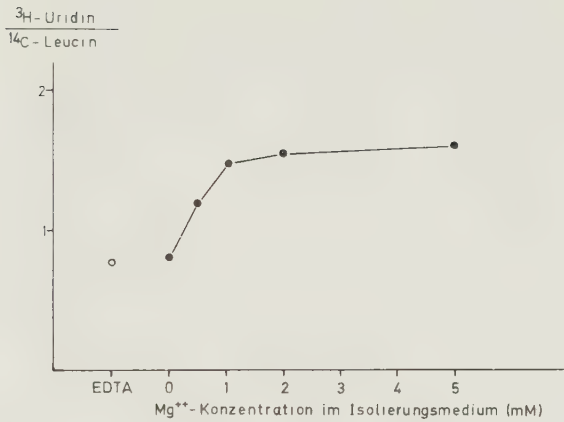


Abb. 13 Abhängigkeit des Ribosomengehalts in Mitochondrien-Präparationen von der Magnesium-Konzentration im Isolierungsmedium.

Die ribosomale RNS wurde mit ^3H -Uridin markiert, das Protein mit ^{14}C -Leucin. Als Maß für den Ribosomengehalt der Mitochondrien gilt das Verhältnis der ^3H -Uridin-Markierung der RNS zur ^{14}C -Leucin-Markierung des Proteins.



Abb. 14 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mitochondrien-Präparation, die in SAT + 10 mM EDTA isoliert worden ist. (x 25 000).

SAT: 0,5 M Saccharose, 5 mM NH_4Cl , 30 mM Tris-HCl, 1 mM Mercapto-
äthanol, pH 7,4.

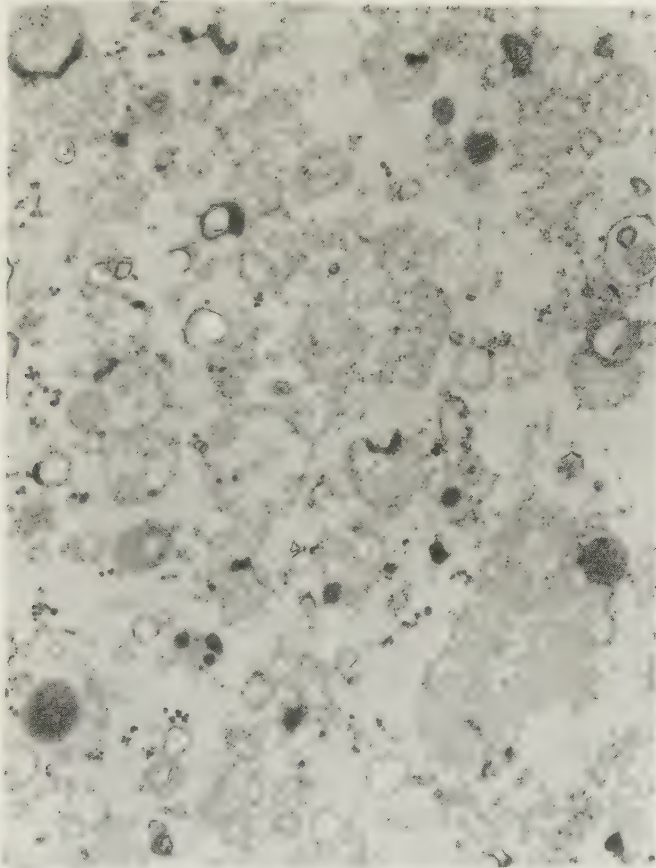


Abb. 15 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mitochondrien-Präparation, die in SAT + 5 mM MgCl_2 isoliert worden ist (x 25 000).
SAT: siehe Abb. 14.

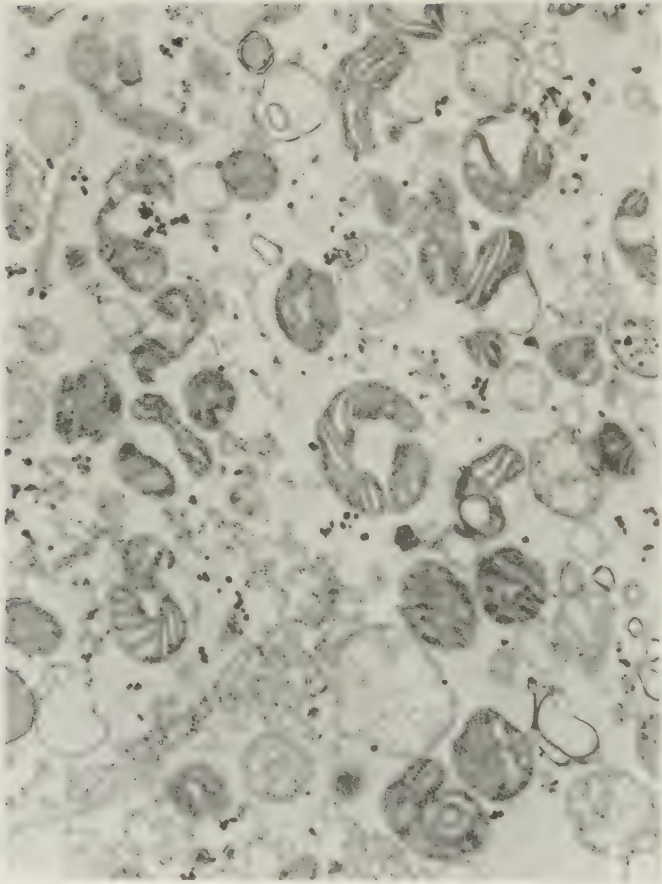


Abb. 16 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mitochondrien-Präparation, die in SAT ohne EDTA und $MgCl_2$ isoliert worden ist (x 20 000).
SAT: siehe Abb. 14.

Die mit EDTA isolierten Mitochondrien lassen ähnlich wie in Abb. 11 A intakte Mitochondrien ohne extramitochondriale Ribosomen erkennen (Abb. 14). Isolierung mit 5 mM $MgCl_2$ (Abb. 15) führt zur Zerstörung der mitochondrialen Strukturen. Zahlreiche Vesikel, die z. T. dicht mit Ribosomen besetzt sind, beherrschen neben mitochondrialen Strukturen das Bild. Die mit 0,5, 1,0 und 2,0 mM $MgCl_2$ isolierten Mitochondrien zeigen ähnliche Veränderungen.

Bei Aufschluß der Zellen im 5fachen Volumen des SAT-Mediums ohne EDTA und Mg^{++} zeigt Abb. 16 zum überwiegenden Teil intakte Mitochondrien, deren Außenmembranen klar zu erkennen sind. Daneben finden sich mikrosomale Strukturen, an welchen deutlich Ribosomen aufgereiht sind. An den Außenmembranen der Mitochondrien können keine Ribosomen nachgewiesen werden. Nur in wenigen Fällen, in denen keine Außenmembranen sichtbar sind, sind Ribosomen an mitochondrialen Strukturen zu erkennen. Die Analyse der Mg^{++} -Konzentration im Homogenat des SAT-Aufschlusses mit Hilfe von Atomabsorption ergab 1 mMol Mg^{++} /l. Offenbar reicht das intrazelluläre Magnesium zur Erhaltung der Bindung zwischen Ribosomen und Membranen aus.

In Abb. 17 ist die elektronenmikroskopische Aufnahme einer aus dem postmitochondrialen Überstand des SAT-Aufschlusses gewonnene Fraktion gezeigt. Sie wurde 30 min bei 48 000 x g sedimentiert und wird als Mikrosomen-Fraktion bezeichnet. In dieser Fraktion beherrschen Vesikel unterschiedlicher Größe das Bild. Sie sind zum Teil glatt, zum Teil mehr oder weniger dicht mit Ribosomen besetzt. Vereinzelt erkennt man intakte Mitochondrien.

Nach Zentrifugieren des postmitochondrialen Überstandes 30 min bei 48 000 x g wurde nochmals 1 h bei 78 000 x g zentrifugiert. Dabei wurde ein farbloses Ribosomenpellet erhalten, auf dem sich eine orangerote Schicht befand. In Abb. 18 ist die elektronenmikroskopische Aufnahme dieser mit Puffer leicht ablösbaren Schicht wiedergegeben. Neben einer Vielzahl freier Ribosomen kann man nahezu ausschließlich glatte, nicht mit Ribosomen besetzte Vesikel erkennen.

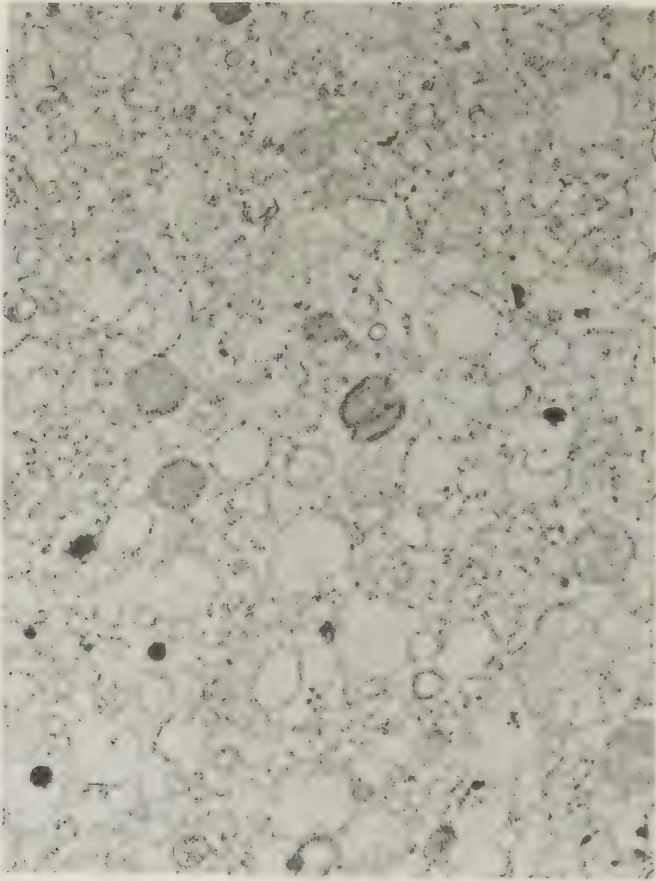


Abb. 17 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer aus dem postmitochondrialen Überstand in 30 min bei 48 000 x g sedimentierbaren Mikrosomenfraktion (x 21 000).

Die Zellen wurden mit SAT-Medium aufgeschlossen. Das Mikrosomenpellet wurde 1 x mit SAT-Medium gewaschen.

SAT: siehe Abb. 14.

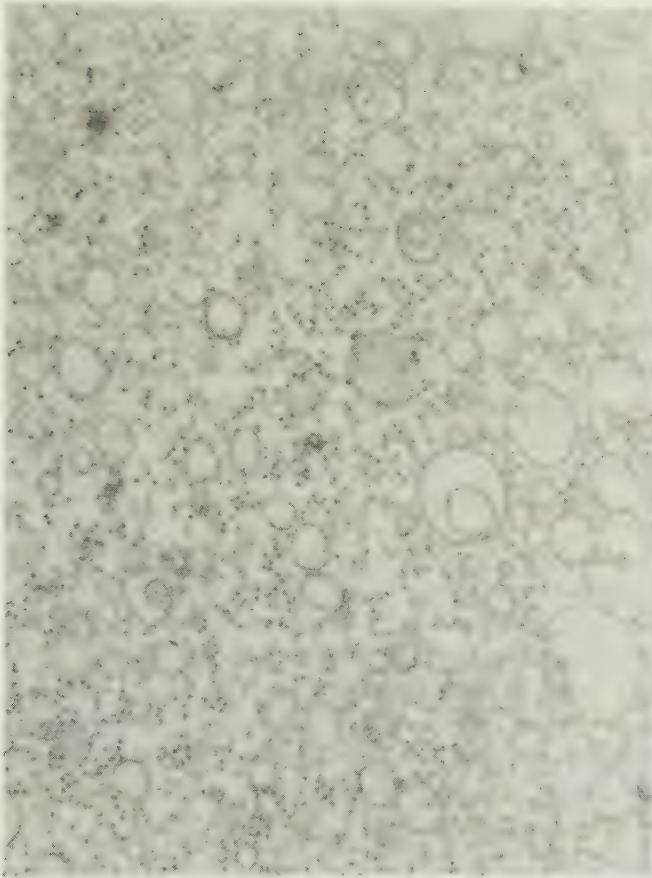


Abb. 18 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer aus dem postmikrosomalen Überstand in 1 h bei 78 000 x g sedimentierbaren Vesikelfraktion (x 54 000).

Aufschluß der Zellen mit SAT-Medium. Nach Zentrifugation des postmikrosomalen Überstandes 1 h bei 78 000 x g befindet sich auf dem farblosen Ribosomenpellet eine orangerote Schicht. Diese Schicht wurde mit Isolierungspuffer durch Schwenken abgelöst und elektronenmikroskopisch untersucht.

3.1.2.2. Charakterisierung der Zellfraktionen durch ihre RNS-Gehalte und Marker-Enzymaktivitäten

Die Zellfraktionierung für die in Kapitel 3.2. beschriebenen Experimente wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Für in vivo-Experimente wurden die Hyphen mit dem 5fachen Volumen SAT-Medium homogenisiert (Ultraturrax) und mit einer Zelmühle aufgeschlossen. Für in vitro-Experimente erfolgte der Zellaufschluß durch Reiben der Hyphen mit Seesand in Gegenwart des 0,5fachen Volumens Inkubationsmedium (siehe 4.2.3.).

Das aufgeschlossene Material wurde zweimal 5 min bei 2 000 x g zentrifugiert. Der jeweils entstandene Überstand wird in den folgenden Experimenten als 'Homogenat' bezeichnet. Dieses Homogenat wurde zur Sedimentation der Mitochondrien 12 min bei 17 300 x g zentrifugiert, das Pellet entweder mit dem jeweiligen Isolierungsmedium oder mit SET-Medium (Experimente in Kapitel 3.2.) durch Resuspendieren und Rezentrifugieren gewaschen.

Der postmitochondriale Überstand wurde 30 min bei 48 000 x g zentrifugiert und das entstandene Pellet durch Resuspendieren im jeweiligen Isolierungsmedium und Rezentrifugieren gewaschen. Es wird als Mikrosomenfraktion bezeichnet. Aus dem Überstand wurden in 2 h bei 165 000 x g die freien Ribosomen einschließlich leichter Membranen sedimentiert. Das Sediment wurde im jeweiligen Medium resuspendiert, jedoch keiner weiteren Reinigung unterzogen. Es wird im folgenden als Ribosomenfraktion, der resultierende Überstand als Cytosol bezeichnet.

Die nach Aufschluß der Zellen in verschiedenen Isolierungsmedien (SET, SAMT, SAT) erhaltenen Zellfraktionen wurden durch ihre RNS-Gehalte und durch Marker-Enzymaktivitäten charakterisiert (Tabelle 5). Alle Prozentangaben beziehen sich auf die Summe der Zellfraktionen.

In allen drei Aufschlüssen liegt der Proteinanteil der Mitochondrienfraktionen zwischen 9 und 14 % des Gesamtproteins im Homogenat. Der Proteinanteil der Mikrosomenfraktion liegt zwischen 4 und 7 %. Der größte Teil des Proteins verteilt sich auf die Ribosomenfraktion und das Cytosol.

Tabelle 5 Charakterisierung der Zellfraktionen aus *Neurospora crassa* nach Aufschluß der Zellen in verschiedenen Isolierungsmedien.

Die Zellen wurden mit dem 5fachen Volumen des jeweils angegebenen Mediums homogenisiert und mit einer Zelmühle aufgeschlossen. Nach zweimaliger Zentrifugation 5 min bei 2 000 x g wurden die Mitochondrienfraktionen in 12 min bei 17 300 x g sedimentiert und durch Resuspendieren im jeweiligen Medium und Rezentrifugieren einmal gewaschen. Aus dem postmitochondrialen Überstand wurden die Mikrosomenfraktionen in 30 min bei 48 000 x g zentrifugiert und einmal gewaschen. Aus dem postmitochondrialen Überstand wurden die Mikrosomenfraktionen in 30 min bei 48 000 x g zentrifugiert und einmal gewaschen. Aus dem postmitochondrialen Überstand wurden die Mikrosomenfraktionen in 30 min bei 48 000 x g zentrifugiert und einmal gewaschen. Die Ribosomenfraktionen wurden in 2 h bei 165 000 x g sedimentiert, sie enthalten auch die 'leichte' Mikrosomenfraktion.

Alle Prozentangaben beziehen sich auf die Summe der einzelnen Fraktionen. Die RNS-Gehalte wurden aus Aliquoten der Zellfraktionen durch Präzipitation mit HClO_4 , Extraktion bei 90° C und Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt.

Spezifische Enzymaktivitäten: nMol Cytochrom c reduziert/min x mg Protein.

	Protein- verteilung	% Ges.- Homogenat	OD ₂₆₀ mg Prot.	$\mu\text{g RNS}$ mg Prot.	RNS-Ver- teilung		NADPH-Cyt. c Reduktase		Succinat-Cyt. c Reduktase	
					% Ges.- Homogenat	Spez.- Akt.	% Ges.- Akt.	Spez.- Akt.	% Ges.- Akt.	Spez.- Akt.
SET	Mitochondrien	9,2	0,8	40	1,6	4,2	1,1	328,7	65,4	
	Mikrosomen	4,1	0,6	30	0,5	86,1	9,7	277,7	24,6	
	Ribosomen	49,4	9,7	485	87,5	45,8	62,5	5,6	6,0	
	Cytosol	36,8	1,6	80	10,7	26,3	26,7	5,0	4,0	
SAMT	Mitochondrien	13,3	2,1	105	5,1	18,0	8,5	447,0	88,0	
	Mikrosomen	6,4	5,6	280	6,6	164,6	37,4	70,8	6,7	
	Ribosomen	32,0	14,2	710	82,8	22,9	26,0	4,6	2,2	
	Cytosol	48,0	0,6	30	5,6	16,5	28,1	4,4	3,1	
SAT	Mitochondrien	11,0	1,0	50	2,1	4,5	1,4	359,1	74,3	
	Mikrosomen	5,6	2,4	120	2,6	57,1	9,3	178,5	18,8	
	Ribosomen	46,0	9,8	490	87,9	45,6	60,8	2,8	2,4	
	Cytosol	37,0	1,0	50	7,4	26,5	28,4	6,5	4,5	

Die spezifischen RNS-Gehalte ebenso wie die RNS-Verteilung bestätigen die in Kapitel 3.1.1.1. beschriebenen Daten. Aufschluß der Zellen in Gegenwart von Mg-Ionen bewirkt ein Ansteigen des RNS-Gehaltes in den Mitochondrien (105 µg RNS/mg Protein bzw. 5,1 % der Gesamt-RNS). Bei Mg-freier Isolierung ergibt sich für die Mitochondrienfraktion ein gegenüber EDTA-Isolierung (40 µg RNS/mg; 1,6 %) geringfügig erhöhter Wert von 50 µg RNS/mg bzw. 2,1 % der Gesamt-RNS.

Die Mikrosomenfraktionen zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede. Isolierung in EDTA bewirkt offenbar eine weitgehende Ablösung der Ribosomen (30 µg RNS/mg Protein; 0,5 % der Gesamt-RNS). Durch Isolierung in Gegenwart von Mg-Ionen gelangt ein Anteil von 6,6 % der Gesamt-RNS in die Mikrosomenfraktion (280 µg RNS/mg Protein). Bei Mg-freier Isolierung enthält die Mikrosomenfraktion etwas weniger als den halben RNS-Gehalt der Mg-Präparation (120 µg RNS/mg Protein). Dies könnte bedeuten, daß entweder im Falle der Mg-Isolierung freie Ribosomen durch Aggregation in die Mikrosomenfraktion gelangen oder aber, daß es bei Mg-freier Präparation zu einer teilweisen Ablösung von membrangebundenen Ribosomen kommt.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Aktivitäten der NADPH-Cytochrom c Reduktase und der Succinat-Cytochrom c Reduktase (SDH) bestimmt. Die SDH gilt allgemein als Markerenzym für die Mitochondrien (88). Die NADPH-Cytochrom c Reduktase wurde in Rattenleber als Marker für das endoplasmatische Retikulum beschrieben (89 - 91).

Die schwere oder 'rauhe' Mikrosomenfraktion wird als eine vorwiegend aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum entstandene Vesikelfraktion aufgefaßt. Die leichten oder 'glatten' Mikrosomen bestehen dagegen wahrscheinlich nicht nur aus Bruchstücken des glatten endoplasmatischen Retikulums, sondern auch aus Membranen anderer Herkunft, z. B. Plasmamembranen, Microbodymembranen, Glyoxysomenmembranen. Die höchsten spezifischen Aktivitäten ergeben sich somit für die 'rauhe' Mikrosomenfraktion. Sie wird daher zur Bestimmung der gegenseitigen Kontamination von Mitochondrien durch Bruchstücke des endoplasmatischen Retikulums und umgekehrt herangezogen (88).

Die Enzymaktivitäten der SDH in Tabelle 5 zeigen, daß durch Aufschluß der Zellen in Mg-haltigem Medium 88 % der im Gesamthomogenat vorhandenen Mitochondrien in 12 min bei 17 300 x g sedimentierbar sind. Bei Präparation mit SAT- oder SET-Medium verbleiben dagegen 25 - 35 % der Mitochondrien im post-mitochondrialen Überstand.

Die spezifischen Aktivitäten der NADPH-Cytochrom c Reduktase in den Mitochondrienfraktionen zeigen im Falle der Mg-Präparation eine stärkere Kontamination der Mitochondrien durch Mikrosomen an. Die spezifischen Aktivitäten (nMol Cytochrom c reduziert/min x mg Protein) in den verschiedenen Präparationen betrugen: SET-Mitochondrien, 4,2; SAMT-Mitochondrien, 18,0; SAT-Mitochondrien, 4,5. Diese Verteilung der NADPH-Cytochrom c Reduktase zeigt in den SAMT-Mitochondrien mit 8,5 % der Gesamtaktivität gegenüber SET-Mitochondrien (1,1 %) und SAT-Mitochondrien (1,4 %), daß durch Mg-Ionen ein erheblicher Teil der Mikrosomen in die Mitochondrienfraktion gelangt. Der Anteil der gesamten NADPH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität in der Mikrosomenfraktion beträgt bei SET- und SAT-Aufschluß 9,7 bzw. 9,3 %; in der Ribosomenfraktion einschließlich der glatten Mikrosomen 62,5, bzw. 60,8 %; im Cytosol verbleiben etwa 26 - 27 % der Gesamt-Aktivität.

Der relativ hohe Anteil im Cytosol könnte auf eine Lokalisierung des Enzyms in gelöster Form im Cytosol hinweisen, wahrscheinlicher ist jedoch eine unvollständige Sedimentation der in ihrer Größe recht unterschiedlichen Mikrosomenvesikel.

Bei Aufschluß der Zellen in Gegenwart von Mg-Ionen (10 mM) dagegen gelangen in die Mikrosomenfraktion 37,4 % der gesamten NADPH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität.

Diese Daten führen zu dem Schluß, daß die Gegenwart von Mg-Ionen im Isolierungsmedium zu einer Aggregation von mitochondrialen und mikrosomalen Membranen führt; sie besitzen anscheinend eine negative Oberflächenladung. Dies bedingt eine schnellere Sedimentation der Mitochondrien (höhere Mitochondrienausbeute im 12 min 17 300 x g-Pellet). Insbesondere aber beobachtet man eine Verlagerung der NADPH-Cytochrom c Reduktase-Verteilung in die bei

niedrigen g-Zahlen sedimentierenden Fraktionen.

Eine ähnliche Aggregationsneigung ist auch für die Membranen des endoplasmatischen Retikulums aus Rattenleber bekannt (92, 93).

3.2. Kinetik des Transports cytoplasmatisch synthetisierter Proteine in die Mitochondrien in vivo und in vitro

Die in Kapitel 3.1. beschriebenen elektronenmikroskopischen und analytischen Untersuchungen erbrachten keine Stütze für die von der Arbeitsgruppe um Butow postulierten Synthese von mitochondrialen Proteinen durch mitochondriengebundene cytoplasmatische Ribosomen (49 - 53). Somit war es notwendig, alle Zellfraktionen in bezug auf eine eventuelle funktionelle Bedeutung für die Synthese und den Transport von Proteinen in die Mitochondrien zu untersuchen.

In diesem Kapitel werden Puls- und Puls-Chase-Markierungsexperimente durch Einbau von ^3H -Leucin in ganze Neurospora-Zellen beschrieben. Sie erlauben die zeitliche Verfolgung des neu synthetisierten Proteins in den einzelnen Zellfraktionen. Immunologische Methoden ermöglichen dies auch für einzelne mitochondrien-spezifische Proteine.

Dem Nachweis von Synthese und Transport mitochondrialer Proteine in vivo folgt im zweiten Teil dieses Kapitels die Prüfung eines in vitro-Systems in bezug auf seine Fähigkeit zu Synthese und Transport von Proteinen in die Mitochondrien.

3.2.1. Markierungskinetik des Gesamtproteins und immunologisch identifizierbarer Mitochondrienproteine in den Zellfraktionen durch Einbau von ^3H -Leucin in vivo

3.2.1.1. Puls- und Puls-Chase-Markierung des Gesamtproteins der Zellfraktionen

Dem Kulturmedium wachsender Zellen zugesetztes Leucin wird außerordentlich schnell in den intrazellulären Aminosäure-Pool aufgenommen und anschließend in die Proteine eingebaut (94, 95). Dies gilt auch, wenn Leucin in sehr geringen Konzentrationen (ca. 10 $\mu\text{Mol/l}$) angeboten wird. Wird der Kultur nach Zugabe von radioaktivem Leucin ein Überschuß an unmarkiertem Leucin zugesetzt (25 $\mu\text{Mol/mg}$ Zellprotein), so wird die spezifische Konzentration

an radioaktivem Leucin im intrazellulären Leucin-Pool stark erniedrigt. Die Folge ist, daß praktisch kein radioaktives Leucin mehr zur Synthese von Polypeptidketten nachgeliefert wird. Die zum Zeitpunkt der Chase-Zugabe bereits in die naszierenden Polypeptidketten eingebaute Radioaktivität sollte es erlauben, durch eine kinetische Analyse der einzelnen Zellfraktionen die Translationsprodukte vom Ort ihrer Synthese bis zu ihrem Wirkungsort zu verfolgen.

Alle Neurospora-Kulturen wurden zwecks homogener Markierung des Zellproteins in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat bei 25°C gezüchtet. Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase nach 13 Stunden wurden die Kulturen für zwei weitere Stunden bei $8 - 9^\circ\text{C}$ weitergezüchtet, um die Geschwindigkeit des Proteintransports zu erniedrigen. Nach 15 Stunden wurden die Kulturen durch Zugabe von ^3H -Leucin puls-markiert. Aliquote der Kulturen wurden zu den in Abb. 19 angegebenen Zeiten durch Eis auf 0°C abgekühlt. Nach Ab-saugen wurden die Hyphen bei -6°C mit SAT-Medium aufgeschlossen. Ein Teil der Kulturen wurde 90 sec nach Zugabe von ^3H -Leucin mit einem Leucin-Chase versetzt und wie oben zu den in Abb. 19 angegebenen Zeiten auf 0°C abgekühlt und aufgeschlossen. Die Zellfraktionierung erfolgte wie in Kapitel 3.1.2.2. beschrieben; die Mitochondrienfraktion wurde einmal mit SET-Medium, die Mikrosomenfraktion einmal mit SAT-Medium gewaschen. In allen Zellhomogenaten und Zellfraktionen wurde das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis im TCA-fällbaren Protein ermittelt (Abb. 19).

Die Bestimmung der ^3H -Radioaktivität in den Kulturfiltraten zeigte nach 60 - 90 sec eine ^3H -Leucin-Aufnahme von über 95 % der eingesetzten Radioaktivität. Im Zellhomogenat (siehe 3.1.2.2.) zeigt sich ein linearer Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses. Nach 360 - 720 sec ist der intrazelluläre ^3H -Leucin-Vorrat aufgebraucht, das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis erreicht einen konstanten Wert. Das sofort nach Gabe der Leucin-Chase konstant bleibende $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis im Homogenat zeigt an, daß keine Neubildung von radioaktiven Proteinen mehr erfolgt.

Die cytosolischen Ribosomen zeigen ein schnelleres Ansteigen des

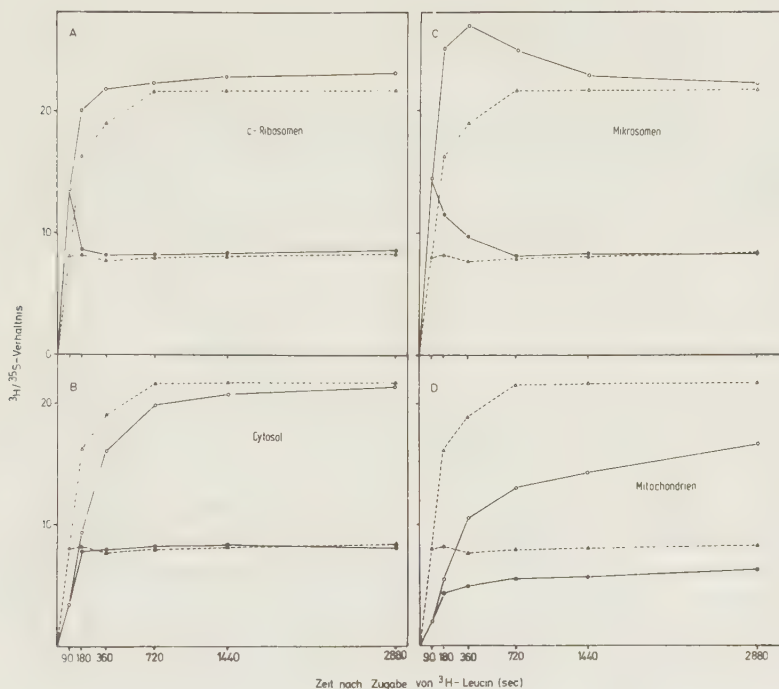


Abb. 19 Kinetik des Einbaus von ^3H -Leucin in das TCA-unlösliche Protein der Subfraktionen und des Gesamthomogenates von *Neurospora crassa*. Die Zellen wurden mit ^{35}S -Sulfat homogen markiert. Die Pulsmarkierung mit ^3H -Leucin erfolgte bei 8°C . Der spezifische Einbau von ^3H -Leucin ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

A: cytoplasmatische Ribosomen;

B: Cytosol;

C: Mikrosomen;

D: Mitochondrien;

○—○: Puls;

●—●: Puls + Chase nach 90 sec;

In A, B, C und D ist der Einbau in das Gesamthomogenat mit aufgezichnet: △-----△, Puls; ▲-----▲, Puls + Chase nach 90 sec.

$^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses gegenüber dem Homogenat, der Leucin-Chase bewirkt einen schnellen Abfall des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses innerhalb von 90 sec. In dieser Zeit werden alle ^3H -Leucin markierten naszierenden Polypeptidketten von den Ribosomen abgelöst und durch unmarkierte naszierende Ketten ersetzt.

Wesentlich langsamer erfolgt die Markierung der cytosolischen Proteine. Nach Zugabe des Leucin-Chase erfolgt innerhalb von 90 sec ein starkes Ansteigen des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses, anschließend bleibt das Verhältnis konstant. Der nach Gabe des Leucin-Chase innerhalb des gleichen Zeitraumes beobachtbare Abfall des Verhältnisses an den Ribosomen und das Ansteigen des Verhältnisses im Cytosol verdeutlicht, daß die cytosolischen Ribosomen ihre naszierenden Peptidketten direkt ins Cytosol abgeben.

Die Mikrosomenfraktion (Abb. 19 C) zeigt ein der Ribosomenfraktion ähnliches, schnelles Ansteigen des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses, erreicht aber nach 360 sec ein Maximum, während der vollständige Einbau des ^3H -Leucins in das gesamte Zellprotein erst nach 720 sec erreicht wird. Nach Erreichen des Maximums sinkt das Verhältnis langsam ab und erreicht nach 2880 sec den für das Homogenat gemessenen Wert. Ebenso charakteristisch ist das im Vergleich zur Ribosomenfraktion wesentlich langsamere Abfallen des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses nach Zugabe des Chase. Dieses Markierungsmuster wird durch die in Abb. 17 veranschaulichte Morphologie der Mikrosomenfraktion verständlich. Diese Fraktion besteht aus einer Vielzahl ribosomenbesetzter Vesikel und legt zusammen mit den in Kapitel 3.1.2.2. dargestellten enzymatischen Daten einen Vergleich mit dem aus tierischen Zellen bekannten rauen endoplasmatischen Retikulum nahe. Das gezeigte Markierungsmuster kann somit durch folgende Interpretation erklärt werden. Nach einer sehr schnellen Markierung der membrangebundenen Ribosomen gelangen die radioaktiven Translationsprodukte zunächst in einen mikrosomalen Pool, aus dem sie mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit wieder verschwinden. Das langsame Verschwinden dieser Polypeptide aus der Mikrosomenfraktion läßt ihr Erscheinen mit einer ähnlichen Geschwindigkeit in einer anderen Zellfraktion erwarten.

Die Markierung der Mitochondrienfraktion weist eine deutliche Verzögerung verglichen mit allen übrigen Fraktionen auf. Nach einer lag-Phase von ca. 90 sec werden die Mitochondrien mit wesentlich kleinerer Geschwindigkeit markiert. Selbst nach 720 sec, wenn das angebotene ^3H -Leucin vollständig aufgebraucht ist und auch der Einbau in die cytosolischen Proteine nahezu abgeschlossen ist, erfolgt noch ein beträchtlicher Einbau in die Mitochondrien, der auch nach 2880 sec seinen Endwert noch nicht erreicht hat. Einen ähnlichen langsamen Einbau von Polypeptiden beobachtet man nach Stoppen der ^3H -Leucin-Aufnahme mittels Chase.

Da der Leucin-Chase auch den ^3H -Leucin-Einbau in die Translationsprodukte der mitochondrialen Ribosomen in kurzer Zeit stoppt (96), muß der beobachtete Einbau nach dem Chase dem Transport von cytosolisch synthetisierten Polypeptiden aus einem extra-mitochondrialen Pool in die Mitochondrien zugeschrieben werden.

Ein tieferes Verständnis dieses Transportprozesses erfordert eine vergleichende kinetische Analyse einzelner chromosomal kodierter Mitochondrienproteine. Als Vertreter der im mitochondrialen Matrixraum lokalisierten Proteine wurden das gesamte Matrixprotein und die mitochondrialen Ribosomenproteine untersucht, als Vertreter mitochondrialer Membranproteine wurden das Cytochrom c und das als Nukleotidcarrier fungierende CAT-bindende Protein herangezogen; beide sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (97 - 101).

3.2.1.2. Immunpräzipitation mitochondrien-spezifischer Proteine aus solubilisierten Mitochondrien

Folgende Proteine wurden aus *Neurospora crassa* isoliert und zur Gewinnung von Antikörpern in Kaninchen injiziert: Cytochrom c wurde in Anlehnung an die von Heller und Smith (102) angegebene Methode, CAT-bindendes Protein nach einer von Prof. Klingenberg freundlicherweise zur Verfügung gestellten Vorschrift hergestellt. Die mitochondriale Matrix wurde aus gereinigten Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung extrahiert. Die Gewinnung

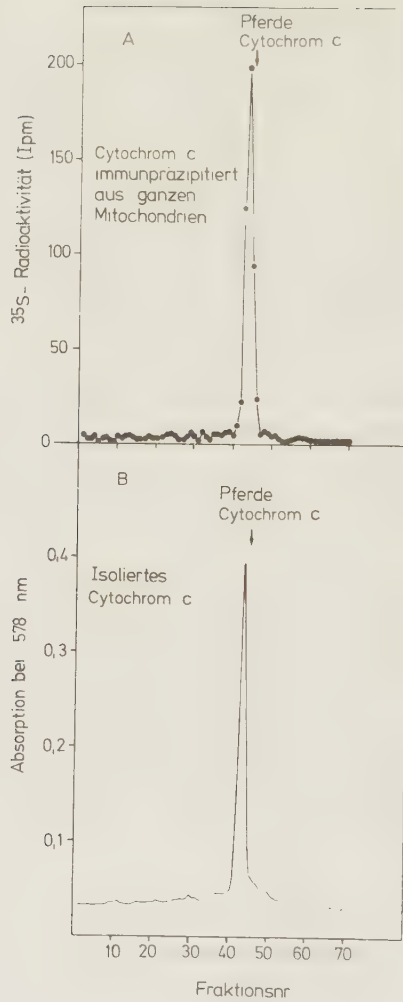


Abb. 20 Immunpräzipitation von Cytochrom c aus *Neurospora*-Mitochondrien.
A: SDS-Gelelektrophorese des Immunpräzipitates aus ^{35}S -markierten Mitochondrien;
B: Densitogramm der zur Immunisierung verwendeten Cytochrom c-Präparation nach SDS-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue.

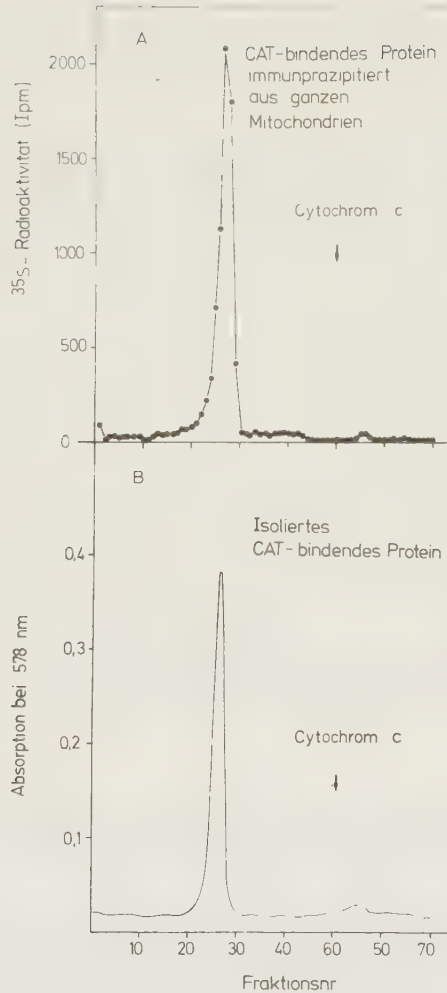


Abb. 21 Immunpräzipitation von Carboxyatractylosid-bindendem Protein (CAT-Protein) aus *Neurospora*-Mitochondrien.

A: SDS-Gelelektrophorese des Immunpräzipitates aus ^{35}S -markierten Mitochondrien;

B: Densitogramm des zur Immunisierung verwendeten, isolierten CAT-Proteins nach SDS-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue.

von Antikörpern gegen die Proteine der mitochondrialen Ribosomen und ihre Spezifität wurde bereits in Kapitel 3.1.1.5. beschrieben.

Homogen mit ^{35}S -Sulfat markierte Mitochondrien wurden mit Triton X-100 solubilisiert und mit den verschiedenen spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden in SDS-haltigem Puffer gelöst und durch SDS-Gelelektrophorese charakterisiert.

In Abb. 20 B ist das Densitogramm der elektrophoretisierten Cytochrom c-Präparation dargestellt. Abb. 20 A zeigt das aus ganzen Mitochondrien mit Antikörpern gegen Cytochrom c präzipitierbare Material. In Abb. 21 A und B sind die Elektropherogramme des zur Immunisierung verwendeten CAT-bindenden Proteins und des mit spezifischen Antikörpern aus Mitochondrien erhaltenen Immunpräzipitats gegenübergestellt. Abb. 20 und 21 lassen die hohe Spezifität der verwendeten Antikörper erkennen. In Abb. 24 ist das mit Antikörpern gegen die mitochondriale Matrix aus Mitochondrien gewonnene Immunpräzipitat elektrophoretisch aufgetrennt. Bezogen auf das Gesamtprotein der Mitochondrien waren präzipitierbar: Cytochrom c, 1 %; CAT-bindendes Protein 5 %; Matrixproteine, 15 - 20 %.

3.2.1.3. Kinetik des Erscheinens mitochondrienspezifischer Proteine in den Mitochondrien

Aus den Mitochondrienfraktionen des kinetischen Experimentes (Abb. 19) wurden verschiedene Proteine immunpräzipitiert und das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis im Präzipitat ermittelt. In Abb. 22 ist die Markierungskinetik von Cytochrom c, dem CAT-bindenden Protein, den gesamten mitochondrialen Matrixproteinen und den Proteinen der mitochondrialen Ribosomen in der Mitochondrienfraktion dargestellt. Die Spezifität der Präzipitate wurde jeweils durch gelelektrophoretische Analyse überprüft. Das unterschiedliche $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis nach vollständigem ^3H -Leucin-Einbau erklärt sich aus den unterschiedlichen Gehalten der Proteine an Leucin (relativ niedrig im Cytochrom c) und Schwefel-Aminosäu-

ren (Methionin, Cystein). Zum besseren Vergleich der Kinetiken wurden in Abb. 23 alle $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse auf das Verhältnis des CAT-Proteins nach vollständigem Einbau umgerechnet.

Auffallend ist die schnelle Markierung des CAT-Proteins, nach 720 sec ist der Einbau abgeschlossen. Die Markierung von Cytochrom c weist demgegenüber eine ausgeprägte Verzögerung auf. Nach dieser lag-Phase erfolgt die Markierung mit ähnlicher Geschwindigkeit wie im Falle des CAT-Proteins. Sowohl die Gesamt-Matrix-Proteine wie auch die Proteine der mitochondrialen Ribosomen, die alle jenseits der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert sind, zeigen eine wesentlich kleinere Markierungsgeschwindigkeit; selbst nach 1440 sec ist der Einbau von radioaktiven Proteinen noch nachweisbar.

Auch nach Gabe des Leucin-Chase wird ein im Vergleich zur Ablösesgeschwindigkeit der naszierenden Ketten von den Ribosomen langsamer Transport radioaktiver Polypeptide in die Mitochondrien beobachtet; die Markierung erfolgt auch hier mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Abb. 24 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der aus Mitochondrien mit Antikörpern gegen die Matrixproteine erhaltenen Immunpräzipitate nach verschiedener Puls -Markierungsdauer. Für die in den Fraktionen 5, 10, 15, 19/20, 22 und 28/29 auftretenden Matrixproteine wurde das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis bestimmt und für jede Fraktion die Markierungskinetik aufgezeichnet (Abb. 25). Auch hier wurden alle Werte auf das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis des in Fraktion 22 erscheinenden Proteins nach vollständigem ^3H -Einbau umgerechnet. Die drei Proteinkomponenten mit einem Molekulargewicht von etwa 40 000 - 80 000 (entsprechend den Fraktionen 5, 10 und 15) werden relativ langsam markiert, während die Proteine mit Molekulargewichten von etwa 20 000 - 40 000 einen raschen Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses zeigen.

Die bereits aus der Kinetik des gesamten Mitochondrienproteins gefolgerte Existenz extramitochondrialer Pools wird somit auch für die untersuchten Proteine wahrscheinlich gemacht. Aus den unterschiedlichen Markierungsgeschwindigkeiten darf für die einzelnen Proteine ein jeweils spezifischer extramitochondrialer

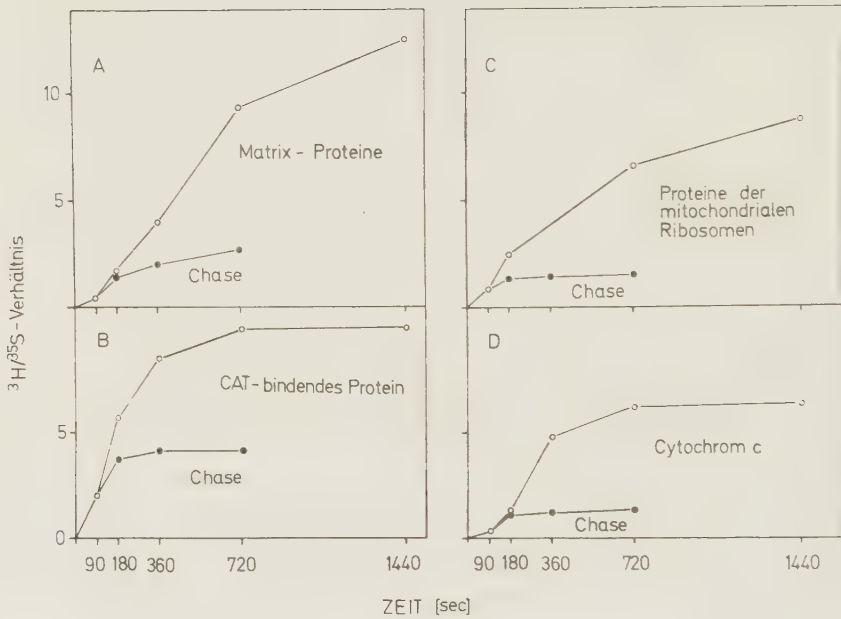


Abb. 22 Kinetik des Erscheinens von ^3H -Leucin-markierten Proteinen in den Mitochondrien nach Puls- und Puls-Chase-Markierung.

Die Zellen wurden mit ^{35}S -Sulfat homogen markiert. Die Puls-Markierung mit ^3H -Leucin erfolgte bei 8°C . Der spezifische Einbau von ^3H -Leucin ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

A: Matrix-Proteine;

B: Carboxyatractylosid-bindendes Protein (CAT-bindendes Protein);

C: Proteine der mitochondrialen Ribosomen;

D: Cytochrom c;

○ ———○: Puls;

● ———●: Puls + Chase nach 90 sec.

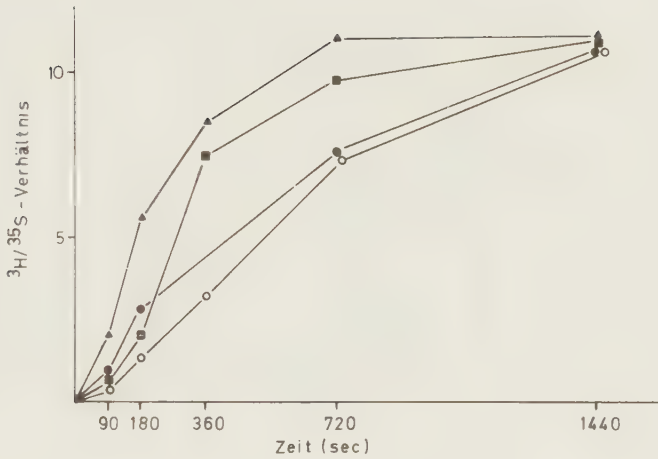


Abb. 23 Kinetik des Erscheinens von ^3H -Leucin-markierten Proteinen in den Mitochondrien nach Puls-Markierung.

Die Einbaukurven aus Abb. 22 wurden auf gleiche $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse nach vollständigem Einbau von ^3H -Leucin (1440 sec) umgerechnet.

- ▲ : CAT-bindendes Protein;
- : Cytochrom c;
- : Proteine der mitochondrialen Ribosomen;
- : Matrix-Proteine.

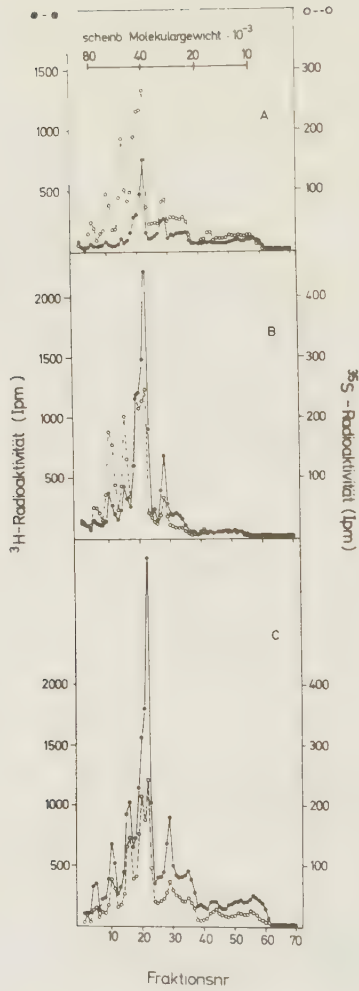


Abb. 24 Gelelektrophoretische Analyse der immunpräzipitierten Matrix-Proteine aus Mitochondrien nach Puls-Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin.

•—•: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;
°-----°: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat;
A: 180 sec Puls;
B: 720 sec Puls;
C: 2880 sec Puls.

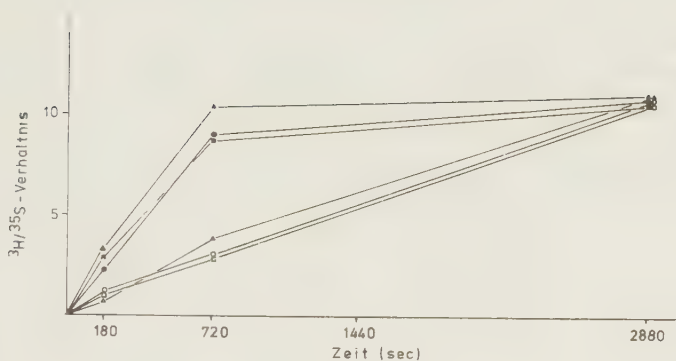


Abb. 25

Kinetik des Erscheinens der in Abb. 24 aufgetrennten ^3H -Leucin markierten Matrix-Proteine in den Mitochondrien nach Puls-Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin.

Die Zellen wurden mit ^{35}S -Sulfat homogen markiert. Die Puls-Markierung erfolgte bei 8°C . Der spezifische Einbau von ^3H -Leucin ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

- ——— ○ : Fraktion 5
- ◻ ——— ◻ : Fraktion 10
- △ ——— △ : Fraktion 15
- ——— ● : Fraktion 19/20
- ——— ■ : Fraktion 22
- ▲ ——— ▲ : Fraktion 28/29

Pool von unterschiedlicher Größe angenommen werden. Diese Annahme ist jedoch nur berechtigt, wenn nicht nur die endgültigen Formen dieser Proteine in den Mitochondrien erfaßbar sind, sondern auch mögliche intramitochondriale Vorstufen. Immunologisch nicht erfaßbare intramitochondriale Vorstufen sind z. B. für das Cytochrom c zu erwarten für den Fall, daß die Kopplung des Häms mit dem Apo-Cytochrom c in den Mitochondrien stattfindet. Unter Berücksichtigung der erwähnten Einschränkung bedeutet die schnelle Markierung des CAT-Proteins (Molekulargewicht ca. 30 000) einen im Vergleich zu den übrigen untersuchten Proteinen kleineren extramitochondrialen Pool. Den Proteinen mit hohen Molekulargewichten, den in den Fraktionen 5, 10 und 15 auftretenden Matrixproteinen (Abb. 24), muß entsprechend ein größerer extramitochondrialer Pool zugeschrieben werden.

3.2.1.4. Erfassung extramitochondrialer Pools von mitochondrialen Proteinen

Experimente zur Identifizierung von möglichen Vorstufen mitochondrialer Proteine im extramitochondrialen Raum lassen eine Reihe von Schwierigkeiten experimenteller Art erwarten. Die Erkennung der Vorstufen durch spezifische Antikörper könnte z. B. durch eine andere Konformation der Vorstufen verhindert werden. Ein weiteres Problem liegt in einer möglichen artefiziellen Umverteilung der Proteine während der Isolierung der Zellfraktionen durch unspezifische Adsorption, proteolytischen Abbau oder durch Auslaufen des Inhalts von Zellorganellen.

Bei den in diesem Kapitel dargestellten Experimenten wurde außer den Mitochondrienfraktionen auch aus den Mikrosomenfraktionen und den cytosolischen Fraktionen mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und das gefällte Material gelelektrophoretisch untersucht. Die Doppelmarkierung der Neurospora-Zellen erlaubt es, zumindest das artefizielle Auslaufen von mitochondrialen Proteinen zu berücksichtigen. Das homogen mit ^{35}S -Sulfat markierte Mitochondrien-Protein stellt in jedem Falle altes, bereits zu Beginn des Zellwachstums an seinen funktionellen Wirkungsort in den Mitochondrien transportiertes Protein dar. Somit sollten alle

^3H -Leucin puls-markierten Vorstufen im extramitochondrialen Raum ausschließlich ^3H -Leucin-Markierung aufweisen, jegliche ^{35}S -Markierung muß einer Kontamination der nichtmitochondrialen Fraktionen durch Mitochondrien oder einem Auslaufen der mitochondrialen Matrix zugeschrieben werden.

Die ^{35}S -Radioaktivitäten von immunpräzipitierten mitochondrialen Proteinen in den Mikrosomenfraktionen und dem Cytosol wurden in den folgenden kinetischen Darstellungen mit den entsprechenden $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnissen der Mitochondrien multipliziert und die errechnete, aus Mitochondrien stammende ^3H -Radioaktivität von der immunpräzipitierten ^3H -Radioaktivität subtrahiert.

Die mit Antikörpern gegen die Matrixproteine erhaltenen Präzipitate zeigen folgende Verteilung der ^{35}S -Radioaktivität:

Mitochondrien 41,3 %; Mikrosomen 9,5 %; Cytosol 49,2 %.

Die ^{35}S -Markierung der Mikrosomen ist vermutlich kontaminierenden Mitochondrien zuzuschreiben, das Vorkommen von fast 50 % aller ^{35}S -markierten Matrixproteine im Cytosol bedeutet, daß der Matrixinhalt von etwa 50 % der Mitochondrien während der Subfraktionierung in das Cytosol gelangt ist.

Abbildung 26 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung des Immunpräzipitats aus dem Cytosol nach 720 sec Puls-Markierung. Sowohl die ^{35}S -Grundmarkierung wie auch die ^3H -Puls-Markierung läßt eine Identifizierung mit den aus Mitochondrien fällbaren Komponenten zu. In Abbildung 27 sind die Veränderungen der ^3H -Leucin-Radioaktivität in den verschiedenen Fraktionen nach Korrektur dargestellt. Alle Werte beziehen sich auf einen Milliliter Zellhomogenat, entsprechend 0,1 g Neurospora-Zellen (Feuchtgewicht).

Die Markierung der Mikrosomenfraktion ist relativ niedrig, dagegen wird das aus dem Cytosol präzipitierbare Material schnell markiert und nimmt nach 360 sec langsam ab. Ebenso zeigt das Abnehmen der ^3H -Radioaktivität nach Zugabe des Leucin-Chase an, daß extramitochondriale Matrixproteine aus dem Cytosol verschwinden. Sie erscheinen mit der charakteristischen, verzögerten und langsamen Markierungskinetik in den Mitochondrien. Diese direkte Beziehung zwischen der Markierung des Cytosols und der Mitochon-

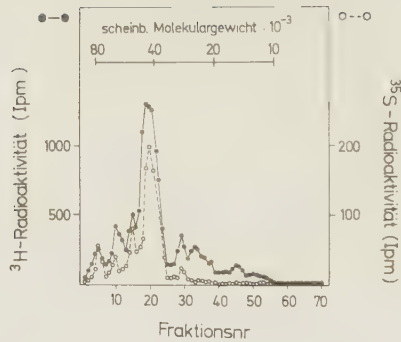


Abb. 26 Gelelektrophoretische Analyse der immunpräzipitierten Matrix-Proteine aus dem Cytosol nach Puls-Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin für 720 sec.

• ———•: Puls-Markierung; °-----°: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

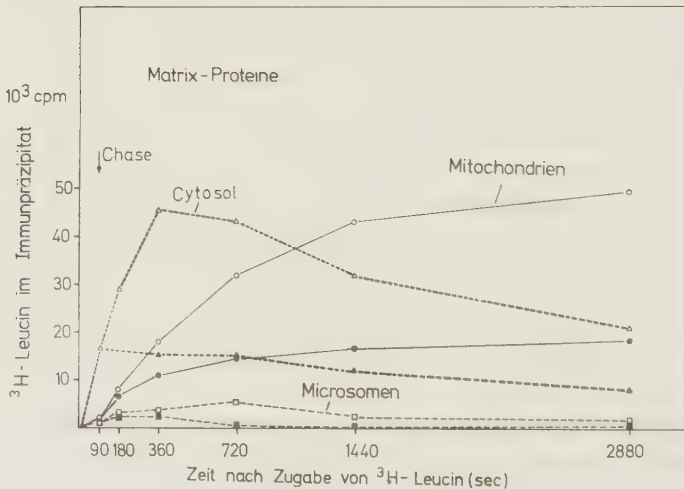


Abb. 27 Veränderungen der ^3H -Leucin-Radioaktivität in den immunpräzipitierten Matrix-Proteinen aus verschiedenen Zellfraktionen nach Puls- und Puls-Chase-Markierung ganzer Zellen.

offene Symbole: Puls;
geschlossene Symbole: Puls + Chase nach 90 sec.

drien würde bedeuten, daß für die mitochondrialen Matrixproteine ein extramitochondrialer Pool im Cytosol existiert, aus dem die Matrix mit neu synthetisierten Proteinen versorgt wird. Die Frage nach dem wirklichen Ort dieses extramitochondrialen Matrix-Pools muß allerdings offen bleiben, da es experimentell derzeit nicht möglich ist, abzuschätzen, inwieweit das endoplasmatische Retikulum oder andere Zellorganellen während der Fraktionierung ihren Inhalt artefiziell an das Cytosol abgeben.

In Abb. 28 sind die mit Antikörpern gegen das CAT-bindende Protein erhaltenen Immunpräzipitate aus der Mitochondrienfraktion, der Mikrosomenfraktion und dem Cytosol nach 180 sec Puls-Markierung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Antikörper gegen das CAT-Protein präzipitieren aus der Mikrosomenfraktion ^{35}S -markiertes CAT-Protein (Fraktion 22 - 26). Die Korrektur der entsprechenden ^3H -Radioaktivität mit dem $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis der Mitochondrien zeigt, daß das ^3H -markierte CAT-Protein ausschließlich aus kontaminierenden Mitochondrien stammt. Weiterhin werden Proteinkomponenten mit Molekulargewichten im Bereich von 20 000 - 80 000 präzipitiert. Diese Komponenten beherrschen im Falle des Cytosols das Bild (Abb. 28 C). Sie weisen auch eine ^{35}S -Markierung auf. Nach Zugabe eines Leucin-Chase sollte die ^3H -Radioaktivität absinken, wenn es sich bei diesen Komponenten um extramitochondriale Vorstufen handelt. Dies ist nicht der Fall. Nach 180 sec Puls und 10 min Chase zeigt sich weder in den Mikrosomen noch im Cytosol eine Abnahme der ^3H -Markierung.

Entsprechend wurde aus den Zellfraktionen mit Antikörpern gegen Cytochrom c präzipitiert (Abb. 29). Die Mikrosomenfraktion konnte auf Grund zu geringer Radioaktivität im Präzipitat nicht ausgewertet werden. Der Anteil an ^{35}S -markiertem Cytochrom c im Cytosol betrug in verschiedenen Experimenten zwischen 35 und 50 %. Dies ist verständlich, da Cytochrom c ein leicht wasserlösliches Protein ist. Neben dem aus Mitochondrien stammenden Cytochrom c zeigt das Cytosol eine weitere Komponente in Fraktion 18 - 20 mit einem Molekulargewicht von etwa 50 000 - 60 000. Wird nach 180 sec ein Leucin-Chase gegeben (Abb. 29 C), so wird das Cytochrom c entsprechend seiner mitochondrialen Herkunft weiter mit ^3H -Leucin markiert. Die hochmolekulare Komponente zeigt auch in diesem Falle keine Abnahme der ^3H -Markierung.

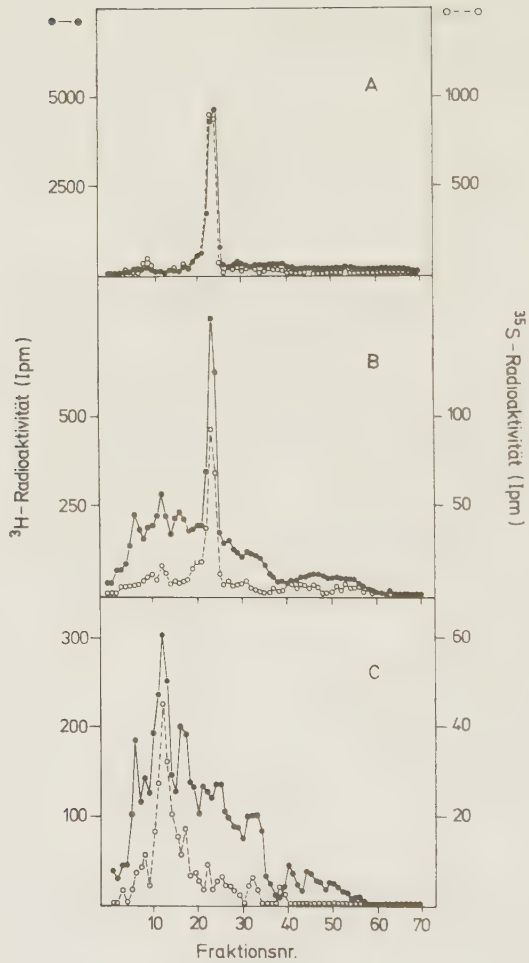


Abb. 28 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitiertem CAT-bindendem Protein aus der Mitochondrienfraktion (A), der Mikrosomenfraktion (B) und dem Cytosol (C) nach 180 sec Puls-Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin.

• ——— •: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;
○ ——— ○: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

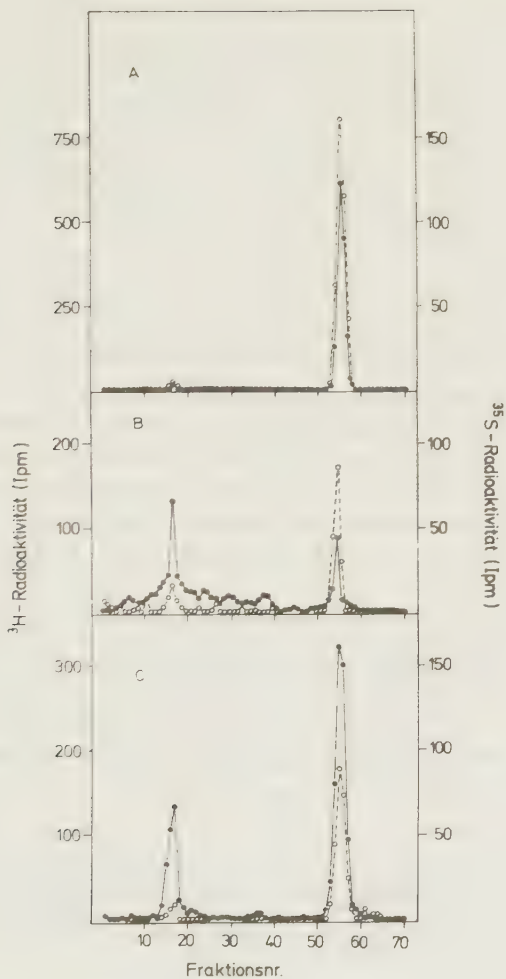


Abb. 29 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitiertem Cytochrom c aus der Mitochondrienfraktion und dem Cytosol nach Pulsmarkierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin.

A: Mitochondrien, 180 sec Puls;
 B: Cytosol, 180 sec Puls;
 C: Cytosol, 180 sec Puls, dann Chase für 10 min;
 •—•—•: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;
 °-----°: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

Nach vorläufigen Ergebnissen mit Antikörpern gegen SDS-behandelte Cytochromoxidase ist aus nichtmitochondrialen Zellfraktionen die Untereinheit 6 vorwiegend aus der Mikrosomenfraktion, die Untereinheit 5 vorwiegend aus dem Cytosol präzipitierbar. Auch hier wird aus dem Cytosol eine Komponente im Molekulargewichtsbereich von 50 000 - 60 000 präzipitiert, deren spezifische Markierung nach Chase-Zugabe nicht abnimmt, während dies für die Untereinheiten 5 und 6 der Fall ist.

Zusammenfassend ergibt sich, daß im Falle der Matrix-Proteine ein extramitochondrialer Pool mit spezifischen Antikörpern erfaßt werden konnte. Für die Untereinheiten 5 und 6 der Cytochromoxidase wird ein extramitochondrialer Pool im Cytosol bzw. in den Mikrosomen vermutet. Die Antikörper gegen das CAT-bindende Protein und gegen Cytochrom c präzipitierten aus nichtmitochondrialen Fraktionen nur die artefiziell aus den Mitochondrien stammenden Proteine. Bemerkenswert ist, daß spezifische Antikörper gegen SDS-behandelte Cytochromoxidase, gegen CAT-bindendes Protein und gegen Cytochrom c aus dem Cytosol hochmolekulare Proteine präzipitieren, die im gleichen Molekulargewichtsbereich von 50 000 bis 60 000 liegen. Diesen Proteinen ist gemeinsam, daß nach Puls-Markierung und anschließender Chase-Zugabe die ³H-Radioaktivität nicht abnimmt. Die Frage nach der Spezifität der Bindung dieser Proteine mit den entsprechenden Antikörpern konnte bisher noch nicht geklärt werden.

3.2.1.5. Einfluß von Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) und Cycloheximid (CHI) auf den Transport von Proteinen in die Mitochondrien

Zur weiteren Untersuchung des Transportmechanismus wurde der Einfluß einer Reihe von Inhibitoren des mitochondrialen Elektronentransports und von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung auf den Transport mitochondrialer Proteine beobachtet. In allen Fällen wurde nur jeweils eine bestimmte Konzentration im Kulturansatz angewandt. In den eingesetzten Konzentrationen wurde nur im Falle des Entkopplers CCCP eine vollständige Hemmung des Einbaus von cytoplasmatischen Proteinen in die Mito-

chondrien erhalten.

Eine homogen mit ^{35}S -Sulfat markierte Neurospora-Kultur wurde 180 sec mit ^3H -Leucin pulsmarkiert. Nach 180 sec wurde ein Aliquot des Ansatzes sofort aufgeschlossen und fraktioniert. Zwei weitere Aliquote wurden nach 180 sec

a) mit einem Leucin-Chase,

b) gleichzeitig mit CCCP und einem Leucin-Chase

versetzt. Beide Ansätze wurden nach weiteren 10 min ebenfalls aufgeschlossen und fraktioniert.

In Tabelle 6 sind die $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse der gesamten Mitochondrien und der daraus mit Antikörpern gegen Cytochrom c und das CAT-bindende Protein erhaltenen Immunpräzipitate wiedergegeben. Das gefällte Material wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Radioaktivitätsprofil in den Abb. 30 und 31 aufgezeichnet. Die $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse der elektrophoretisch gereinigten Proteine sind in Tabelle 6 mit enthalten.

Die Markierungen von ganzen Mitochondrien, von Cytochrom c und von CAT-bindendem Protein zeigen in gleicher Weise, daß CCCP den Einbau blockiert, während in alleiniger Gegenwart des Chase das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis noch beträchtlich ansteigt.

Auffällig in Tabelle 6 ist das sehr niedrige $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis des elektrophoretisch dargestellten CAT-Proteins nach Hemmung des Transports durch CCCP. Der Grund hierfür ist aus Abb. 31 ersichtlich. Nach CCCP-Behandlung erscheint die verschwundene ^3H -Radioaktivität des CAT-Proteins (Fraktion 30 - 35) in den Fraktionen 35 - 45 mit niedrigerem Molekulargewicht.

Das Auftreten von niedermolekularen Komponenten zusammen mit dem verringerten $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis des CAT-Proteins läßt vermuten, daß nach Hemmung des Transports durch CCCP das neusynthetisierte CAT-Protein (^3H -Radioaktivität) dem Abgriff intrazellulärer Proteasen leichter zugänglich ist als bereits in die Innenmembran integriertes CAT-Protein (^{35}S -Markierung).

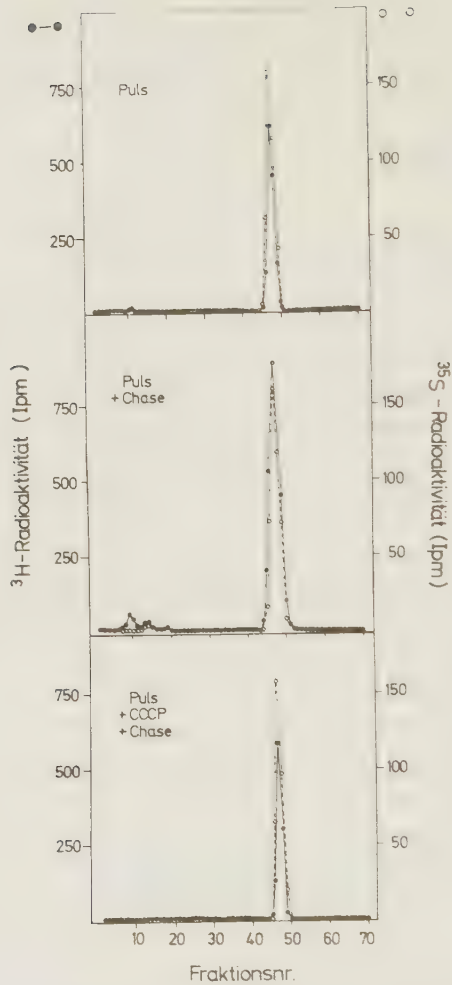


Abb. 30 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitiertem Cytochrom c aus Mitochondrien nach Puls-Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin.

- a) 180 sec Puls; b) 180 sec Puls, dann Chase für 10 min;
c) 180 sec Puls, dann Chase + CCCP für 10 min;

•—•: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;
o-----o: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

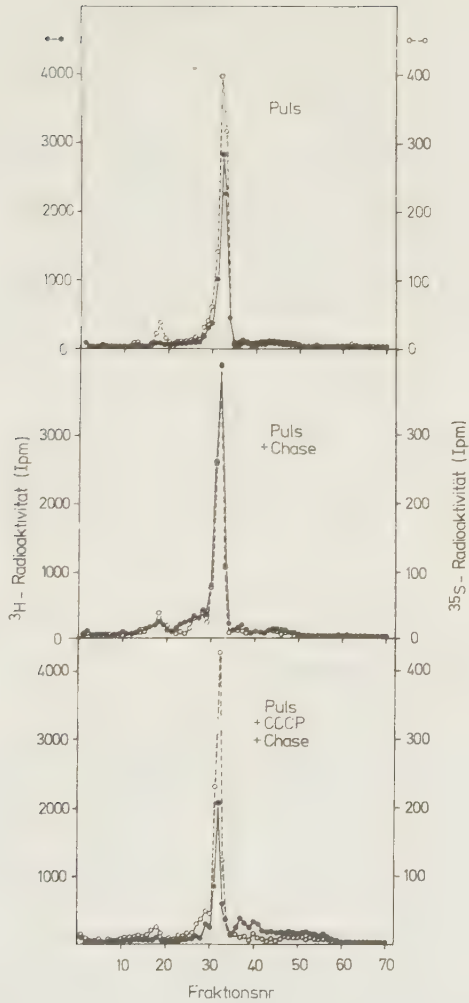


Abb. 31 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitiertem CAT-bindendem Protein aus Mitochondrien nach Puls-Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin.

- a) 180 sec Puls; b) 180 sec Puls, dann Chase für 10 min;
c) 180 sec Puls, dann Chase + CCCP für 10 min;

•—: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;
°-----: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

Tabelle 6 Einfluß von unmarkiertem Leucin (Chase) und von CCCP auf das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis von ganzen Mitochondrien und daraus immunpräzipitiertem Cytochrom c und CAT-bindendem Protein nach Pulsmarkierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin.

Die homogene Markierung der Zellen erfolgte mit ^{35}S -Sulfat.

	$^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis				
	Mitochondrien	Cytochrom c		CAT-Protein	
		Gesamt-Präz.	nach Elpho im Peak	Gesamt-Präz.	nach Elpho im Peak
180 sec Puls	5,3	2,7	3,5	7,7	7,1
180 sec Puls, dann 10 min Chase	8,8	4,1	5,0	10,1	10,1
180 sec Puls, dann CCCP plus Chase für 10 min	5,0	3,7	3,3	6,7	3,7

Die Abhängigkeit von Synthese und Transport mitochondrialer Proteine kann weiterhin durch Hemmung der cytoplasmatischen Proteinsynthese mit CHI untersucht werden. Es kann Aufschluß darüber erwartet werden, ob CCCP tatsächlich den Transport und nicht etwa die Synthese hemmt. Nach der Butow'schen Hypothese (49 - 53) sollte CHI den Einbau von ^3H -Leucin markierten Peptidketten in die Mitochondrien sofort blockieren.

Eine homogen mit ^{35}S -Sulfat markierte Neurospora-Kultur wurde 180 sec mit ^3H -Leucin pulsmarkiert. Nach 180 sec wurde ein Aliquot des Ansatzes sofort aufgeschlossen und fraktioniert. Zwei weitere Aliquote wurden nach 180 sec

a) gleichzeitig mit CHI und einem Leucin-Chase,

b) gleichzeitig mit CHI, mit einem Leucin-Chase und CCCP

versetzt. Nach 20 min wurden die beiden Ansätze ebenfalls aufgeschlossen und fraktioniert.

In Tabelle 7 sind die $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse der Gesamthomogenate und der Mitochondrien dargestellt. Während sich die $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse in den Homogenaten innerhalb der Inkubationszeit nicht verändern, steigt das Verhältnis in den Mitochondrien nach Chase- und CHI-Zugabe weiter an. Nach Zugabe von CHI, Chase und CCCP wird der Einbau von ^3H -Leucin markierten Polypeptidketten in die Mitochondrien gehemmt. Die Wirksamkeit der eingesetzten CHI-Menge wurde in einem Kontrollexperiment durch Pulsmarkierung für 180 sec und anschließende Zugabe von CHI ohne Chase und CCCP überprüft. Der Einbau in das Gesamthomogenat zeigte nach CHI-Zugabe keinen weiteren Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses.

Tabelle 7 Einfluß von CHI und CCCP bei gleichzeitiger Chase-Zugabe auf das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis des Zellhomogenates und der Mitochondrien nach Puls-Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin. Die homogene Markierung der Zellen erfolgte mit ^{35}S -Sulfat.

	$^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis	
	Homogenat	Mitochondrien
180 sec Puls	3,81	1,52
180 sec Puls, dann 20 min CHI + Chase	3,75	2,10
180 sec Puls, dann 20 min CHI + Chase + CCCP	3,85	1,77

Dieses Ergebnis liefert ein weiteres Argument gegen die von Butow aufgestellte Hypothese und deutet darauf hin, daß bei blockierter Proteinsynthese die bereits abgelösten Peptidketten unabhängig von einer weiteren Nachlieferung in die Mitochondrien transportiert werden. Nach Experimenten von Zimmermann (103) durch in vivo-Pulsmarkierung mit ^3H -Leucin und Zugabe eines Leucin-Chase bzw. gleichzeitiger Chase- und CHI-Zugabe kann der Anteil der ^3H -Radioaktivität mitochondrienspezifischer naszierender Peptidketten an der Gesamt- ^3H -Radioaktivität der im extra-

mitochondrialen Raum vorhandenen Vorstufen zu 60 - 70 % abgeschätzt werden. Ca. 30 - 40 % der mitochondrialen Proteinvorstufen sind somit nach ihrer Ablösung von cytoplasmatischen Ribosomen in extramitochondrialen Pools lokalisiert.

3.2.2. Synthese und Transport von Mitochondrien-Proteinen in einem zellfreien Proteinsynthesesystem des Neurospora-Homogenates

Das in vivo-System ist für eine weitere Aufklärung des Transportmechanismus nur begrenzt geeignet. Deshalb wurde ein in vitro-System angestrebt, in dem die Synthese und der Transport von Proteinen in die Mitochondrien untersucht werden konnte.

3.2.2.1. In vitro-Proteinsynthese in einem Zellhomogenat

Neurospora-Zellen wurden in Gegenwart von ^{35}S -Sulfat gezüchtet. Nach 14 Stunden Wachstum wurde nach Zusatz von unmarkierten Sulfationen 1 Stunde lang weitergezüchtet. Dieser Sulfat-Chase soll ausschließen, daß während der nachfolgenden in vitro-Inkubation die ^{35}S -Grundmarkierung durch den intrazellulären eventuell noch radioaktiv markierten Schwefel-Aminosäure-Pool verändert wird. Die Hyphen wurden bei 0° C geerntet und mit Sand und einem von Rücker et al. (68) beschriebenen Inkubationsmedium aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren von nichtaufgeschlossenen Hyphen, von Zellwandmaterial und von Zellkernen bei 2 000 x g für 5 min wurde der Überstand (Zellhomogenat) für die in vitro-Proteinsynthese eingesetzt. Nach Zusatz eines energieregenerierenden Systems wurde der Ansatz mit ^3H -Leucin bei 25° C gestartet (experimentelle Einzelheiten siehe 4.2.3. und 4.6.).

Der Einbau von ^3H -Leucin in TCA-unlösliche Polypeptide ist in Abb. 32 A als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt (Kontrollansatz, durchgehende Linie). Ein Aliquot des Inkubationsansatzes wurde zusätzlich zum Zeitpunkt 0 min mit CCCP versetzt (gepunktete Linie). Die gestrichelte Linie stellt den Zeitverlauf des Einbaus nach Zugabe eines Leucin-Chase zum Zeitpunkt 10 min dar.

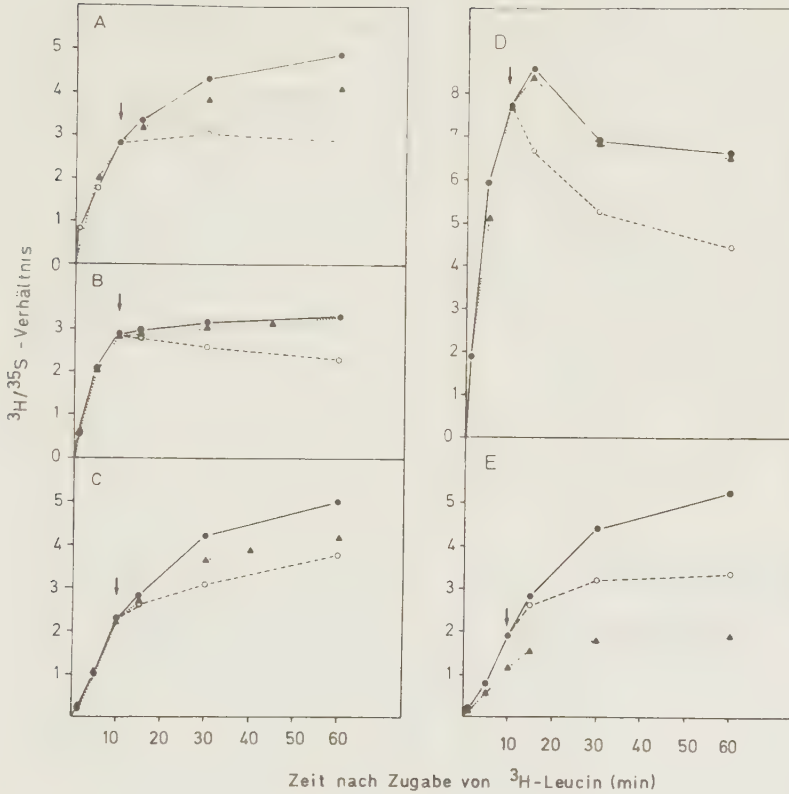


Abb. 32 *In vitro*-Einbau von ^3H -Leucin in das TCA-unlösliche Protein des Gesamthomogenates und der Zellfraktionen von *Neurospora crassa*. Die homogene Markierung der Proteine erfolgte mit ^{35}S -Sulfat. Der Einbau von ^3H -Leucin ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

•—•: Einbau von ^3H -Leucin;
 ○—○: Einbau von ^3H -Leucin, dann Chase nach 10 min;
 ▲.....▲: Einbau von ^3H -Leucin in Gegenwart von CCCP (25 μM);
 A: Homogenat; B: Cytoplasmatische Ribosomen; C: Cytosol;
 D: Mikrosomen; E: Mitochondrien.

Der Einbau des Kontrollansatzes erfolgt für etwa 10 - 20 min sehr schnell, dann bis 60 min nur noch langsam. Die eingebaute ^3H -Radioaktivität erreichte nach 60 min in verschiedenen Experimenten durchschnittlich 5×10^6 Ipm/ml Inkubationsansatz entspr. 0,5 g Zellen (Feuchtgewicht) unter den in Abschnitt 4.6. angegebenen Bedingungen. CCCP zeigt auf den Gesamteinbau während der ersten 10 min keine Wirkung. Anschließend wird der Einbau um 10 - 15 % verringert. In einem nicht dargestellten Parallel-Experiment konnte gezeigt werden, daß der Gesamteinbau mit Cycloheximid, einem spezifischen Hemmer der cytoplasmatischen Proteinsynthese, bis zu 95 % gehemmt wird. Abb. 32 A zeigt weiterhin, daß nach Gabe eines Leucin-Chase der Einbau von ^3H -Leucin in das Protein sofort gestoppt wird.

3.2.2.2. Einbaukinetik von in vitro synthetisierten Polypeptiden in die Mitochondrien

Aliquote der Inkubationsansätze wurden zu den in Abb. 32 angegebenen Zeiten auf 0°C abgekühlt und subfraktioniert. Die Mitochondrienfraktion (Abb. 32 E) zeigt nach einer Verzögerung von etwa 5 min einen langsamen Einbau, der auch nach 60 min noch anhält. Ebenso erfolgt nach Chase-Zusatz noch ein deutlicher Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses, obwohl der Einbau von ^3H -Leucin vollständig gestoppt worden ist (siehe Abb. 32 A). Der Entkoppeler CCCP bewirkt eine Hemmung des Einbaus von etwa 60 %.

Zur Prüfung, inwieweit der restliche Einbau von 40 % der mitochondrialen Proteinsynthese zuzuschreiben ist, wurde der ^3H -Einbau in mitochondriale Translationsprodukte durch Gabe eines Leucin-Chase in Gegenwart von CCCP gestoppt (Abb. 33). Entsprechend dem in Abb. 32 E dargestellten Experiment erfolgt auch nach Zusatz des Leucin-Chase der Einbau von ^3H -Leucin markierten Polypeptiden in die Mitochondrien. Wird dem mit CCCP behandelten Inkubationsansatz nach 10 min ebenfalls ein Leucin-Chase zugegeben, so wird der weitere Einbau vollständig gehemmt. Dieses Experiment macht deutlich, daß der in Gegenwart von CCCP in Abb. 32 E gezeigte Einbau der mitochondrialen Proteinsynthese

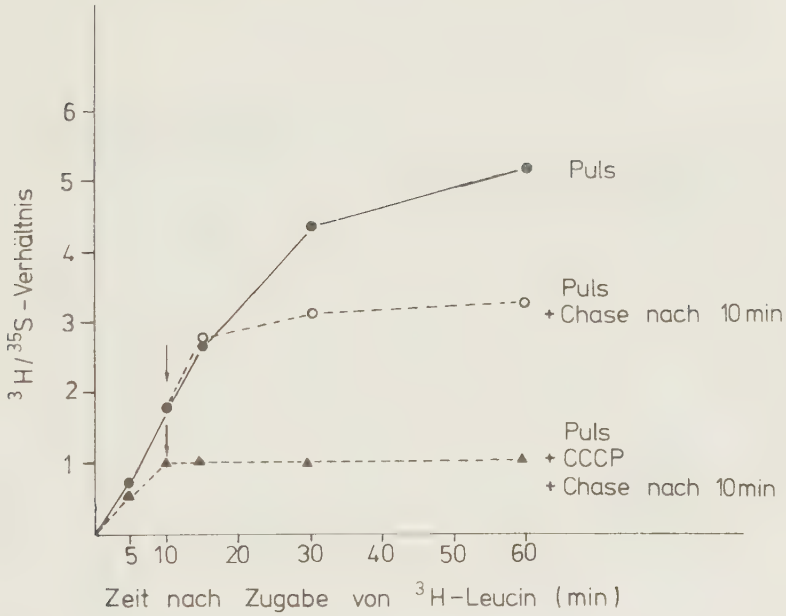


Abb. 33

Hemmung des *in vitro*-Einbaus von ^3H -Leucin markierten Proteinen in die Mitochondrien durch CCCP bei gleichzeitiger Ausschaltung des ^3H -Leucin-Einbaus in mitochondriale Translationsprodukte durch Chase-Zugabe.

Die homogene Markierung der Proteine erfolgte mit ^{35}S -Sulfat. Der Einbau von ^3H -Leucin in TCA-unlösliches Protein ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

entspricht. Die Translation der mitochondrialen Ribosomen wird durch CCCP nicht gehemmt.

3.2.2.3. Markierungskinetik der nichtmitochondrialen Zellfraktionen

In Abb. 32 B, C, D ist der Zeitverlauf des Einbaus von radioaktiven Polypeptiden in die cytoplasmatischen Ribosomen, das Cytosol und die Mikrosomenfraktion wiedergegeben. Die cytoplasmatischen Ribosomen erreichen innerhalb von 10 - 15 min maximalen Einbau. Nach Chase-Zusatz werden für mindestens 50 min ^3H -Leucin markierte naszierende Ketten mit konstanter Geschwindigkeit von den Ribosomen abgelöst, entsprechend einer linearen Abnahme des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses. Das Cytosol erreicht, verglichen mit den Ribosomen, erst nach einer Verzögerung die maximale Einbaugeschwindigkeit nach 5 - 10 min. Sie nimmt nach 10 min langsam ab. Dieser Einbau wird durch Zugabe des Chase nicht wesentlich beeinflusst. Das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis steigt innerhalb von 50 min nahezu linear an. Der weitgehend lineare Abfall bzw. Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses in den cytoplasmatischen Ribosomen und dem Cytosol läßt vermuten, daß die naszierenden Ketten der cytoplasmatischen Ribosomen direkt an das Cytosol abgegeben werden.

Die Mikrosomenfraktion (Abb. 32 D) wird sehr schnell markiert und erreicht nach 15 min maximalen Einbau. Anschließend fällt das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis langsam ab. Dieser Zeitverlauf der Markierung deckt sich weitgehend mit der Pulsmarkierung der Mikrosomen in ganzen Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1.). Bemerkenswert ist die Markierung der Mikrosomen nach Chase-Zugabe. Sie zeigt deutlich ein schnelles Abfallen während der ersten 10 bis 20 min nach Chase-Zugabe. Dieser Phase folgt ein langsames Absinken des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses. Dieser Zeitverlauf des Verschwindens von markierten Polypeptiden aus der Mikrosomenfraktion könnte bedeuten, daß die Translationsprodukte membrangebundener cytoplasmatischer Ribosomen nach Verlassen des Pools der naszierenden Ketten noch einen weiteren Pool durchlaufen, ehe sie die Mikrosomenfraktion verlassen. Mit einer ähnlichen Kinetik erscheinen markierte Polypeptide nach Chase-Zugabe in der Mito-

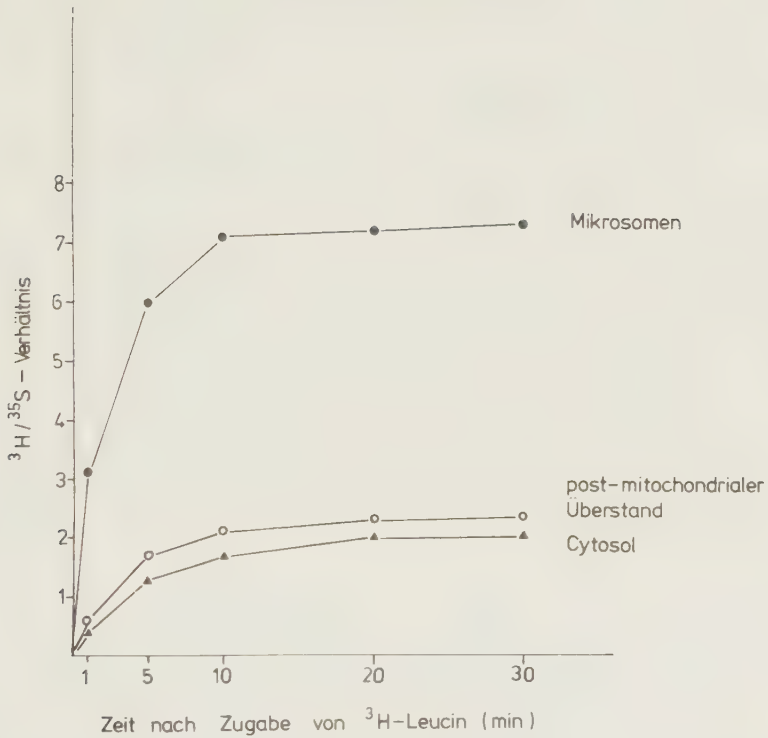


Abb. 34 In vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das TCA-unlösliche Protein des postmitochondrialen Überstandes und Einbau der neusynthetisierten Proteine in die Mikrosomen und das Cytosol.

Die homogene Markierung der Proteine erfolgte mit ^{35}S -Sulfat. Der Einbau von ^3H -Leucin ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

chondrienfraktion (Abb. 32 E). CCCP bewirkt bei allen nicht-mitochondrialen Fraktionen keine wesentliche Veränderung des Einbaus. Andererseits kann eine derartige Kinetik auch durch die Überlagerung verschiedener Einzelkinetiken entstehen, also etwa durch eine gleichzeitige Neubildung der Proteine der Mikrosomen und einer Ablösung der neugebildeten Polypeptidketten von den membrangebundenen Ribosomen.

Ein Argument für die erste Erklärung der Mikrosomenkinetik liefert das folgende Experiment. Aus dem Gesamthomogenat wurden die Mitochondrien abzentrifugiert und der postmitochondriale Überstand zur in vitro-Proteinsynthese mit ^3H -Leucin inkubiert. Abb. 34 zeigt den Einbau von radioaktivem Leucin in den postmitochondrialen Überstand, in die Mikrosomenfraktion und das Cytosol. Die erste Interpretation der Mikrosomenkinetik aus dem Gesamthomogenat läßt den veränderten Verlauf der Mikrosomenkinetik aus dem postmitochondrialen Überstand (Abb. 34) erwarten. Die in der Mikrosomenfraktion neusynthetisierten Mitochondrienproteine können in einem System ohne Mitochondrien nicht mehr an diese abgegeben werden, entsprechend zeigt die Mikrosomenfraktion eine einfache Sättigungskinetik.

Zusammenfassend ergibt sich, daß das spezifische Markierungsverhalten der Zellfraktionen in vivo auch nach Aufschluß der Zellen in dem beschriebenen in vitro-System erhalten geblieben ist.

3.2.2.4. Synthese und Transport von Matrixproteinen in vitro

Zum Nachweis von Synthese und Transport von Matrixproteinen in vitro wurde homogen mit ^{35}S -Sulfat markiertes Zellhomogenat mit ^3H -Leucin inkubiert. Nach 10 min wurde ein Aliquot des Ansatzes mit unmarkiertem Leucin für weitere 30 min inkubiert. 10 min nach Zugabe von ^3H -Leucin bzw. 30 min nach Chase-Zugabe wurden die Zellhomogenate fraktioniert und daraus mit Antikörpern gegen die gesamten Matrixproteine präzipitiert. In Tabelle 8 sind die entsprechenden $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse der Immunpräzipitate angegeben. Abb. 35 und 36 zeigen die gelelektrophoretische Auftrennung der Präzipitate aus den Mitochondrien und dem Cytosol.

Die Mitochondrienfraktion zeigt während der 30minütigen Chase-periode einen starken Anstieg der ^3H -Radioaktivität. Das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis erreicht den 9fachen Wert. Dies bedeutet, daß das Transportsystem für die Matrixproteine intakt geblieben ist.

Tabelle 8 Immunpräzipitation von Matrixproteinen aus den Mitochondrien, den Mikrosomen und dem Cytosol nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das gesamte Zellhomogenat.

Die homogene Markierung der Proteine erfolgte mit ^{35}S -Sulfat. Der Einbau von ^3H -Leucin ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

	10 min Puls	10 min Puls plus 30 min Chase
	$^3\text{H}/^{35}\text{S}$	$^3\text{H}/^{35}\text{S}$
Mitochondrien	0,08	0,72
Mikrosomen	1,31	1,11
Cytosol	1,55	1,33

Abb. 35 A und B zeigen deutlich, daß die immunpräzipitierten, in vitro synthetisierten Proteine in den Mitochondrien weitgehend identisch sind mit den ^{35}S -grundmarkierten Matrixproteinen.

Die ^{35}S -Radioaktivität in den Mikrosomen und im Cytosol entspricht den Verhältnissen in den in vivo-Experimenten (siehe 3.2.1.4.) und zeigt an, daß die Mikrosomen durch Mitochondrien kontaminiert sind (14 % der ^{35}S -Matrixproteine) bzw. daß in das Cytosol ein großer Teil der mitochondrialen Matrix (30 - 50 %) durch artefiziellies Auslaufen der Mitochondrien gelangt. Eine Korrektur der ^3H -Radioaktivitäten in der Mikrosomenfraktion und im Cytosol durch die entsprechenden $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisse in den Mitochondrien (siehe 3.2.1.4.) ist im in vitro-System nicht anwendbar, weil das Auslaufen des Inhaltes der Zellorganellen zumindest zum Teil bereits während des Zellaufschlusses erfolgt.

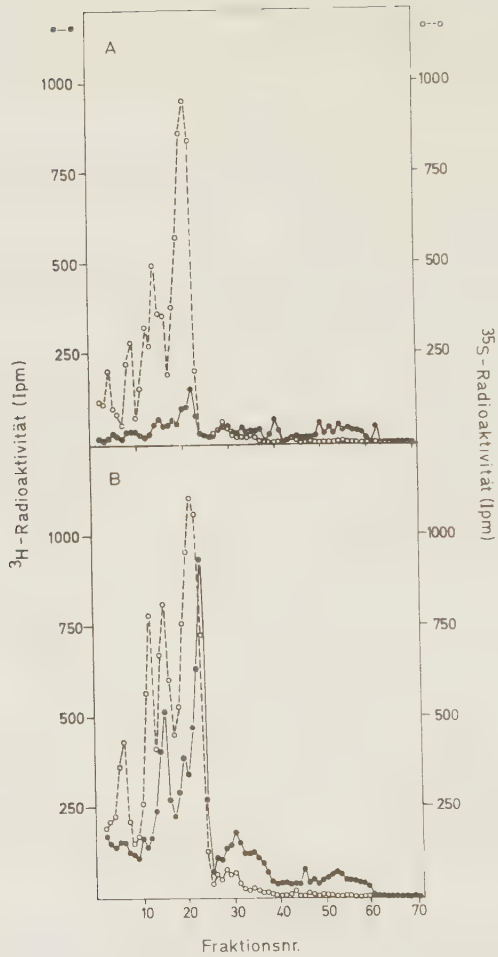


Abb. 35 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitierten Matrixproteinen aus Mitochondrien nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das gesamte Zellhomogenat.

A: 10 min Puls; B: 10 min Puls, dann Chase für 30 min;

•—•: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;

○-----○: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

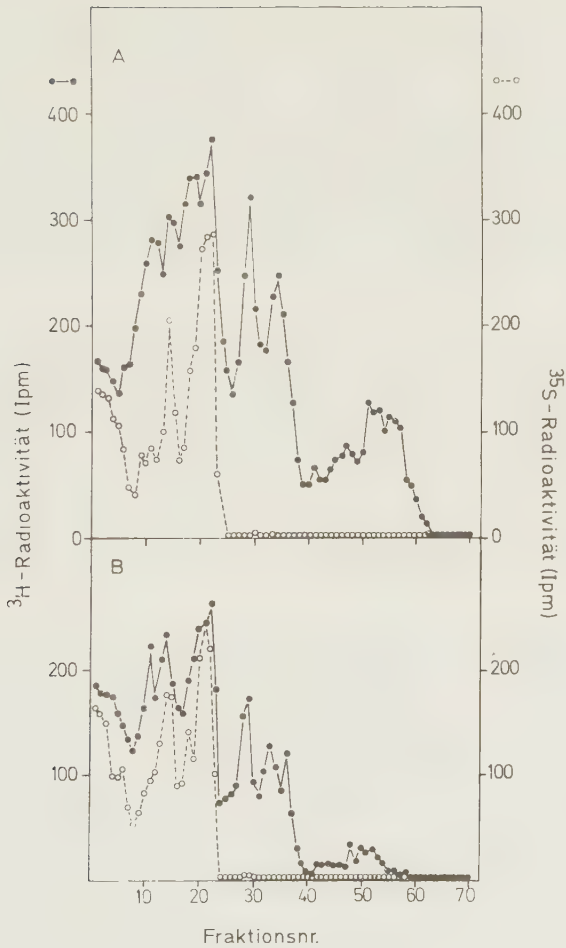


Abb. 36 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitierten Matrixproteinen aus dem Cytosol nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das gesamte Zellhomogenat.

A: 10 min Puls; B: 10 min Puls, dann Chase für 30 min;

•—•: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;

○-----○: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

Im Gegensatz zu den Mitochondrien zeigen sowohl die Mikrosomen wie auch das Cytosol einen Abfall des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses (Tab. 8). Die Radioaktivitätsprofile der elektrophoretisierten Immunpräzipitate aus Mikrosomen waren nicht eindeutig den Matrixproteinen zuzuordnen. Die Immunpräzipitate aus den Cytosolfractionen enthalten einen beträchtlichen Anteil des neu synthetisierten Matrixproteins. Die elektrophoretisch aufgetrennten Präzipitate (Abb. 36 A und B) zeigen eine weitgehende Übereinstimmung der ^3H -markierten Radioaktivitätsgipfel mit den ^{35}S -markierten Matrixgipfeln.

Der Nachweis des Transports von Matrixproteinen in die Mitochondrien im zellfreien System, das Auftreten von in vitro synthetisierten Matrixproteinen im Cytosol und deren teilweises Verschwinden während der Chase-Periode erlaubt zwei verschiedene Interpretationen:

- a) Die in vitro synthetisierten Matrixproteine gelangen zunächst ins Cytosol, von hier aus erfolgt der Transport in die Mitochondrien.
- b) Die Matrixproteine werden im Homogenat an den membrangebundenen Ribosomen synthetisiert und gelangen durch vektoriel-
len Transport in die Mikrosomen, anschließend erfolgt der Transport in die Mitochondrien; während der folgenden Fraktionierung kommt es z. B. durch das Pelletieren und Resuspendieren der Organellen zu einem Auslaufen von in vitro synthetisierten Matrixproteinen aus den Mitochondrien bzw. den Mikrosomen.

Die verwendeten experimentellen Systeme zum Nachweis von neu synthetisierten Matrixproteinen im extramitochondrialen Raum in vivo und in vitro führen somit zu ähnlichen Ergebnissen. Die neusynthetisierten Matrixproteine finden sich außerhalb der Mitochondrien vorwiegend im Cytosol. Der wirkliche Ort des extramitochondrialen Pools von Matrixproteinen kann aus den oben erwähnten Gründen nicht bestimmt werden.

3.2.2.5. Synthese und Transport von Cytochrom c und CAT-bindendem Protein in vitro

Zur Demonstration von Synthese und Transport von Cytochrom c (oder des entsprechenden Apo-Proteins) und von CAT-bindendem Protein wurde das ^{35}S -Homogenat mit ^3H -Leucin inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde gleichzeitig mit CCCP versetzt. Nach 40 min wurden die beiden Homogenate fraktioniert. Aus den gewaschenen Fraktionen wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Cytochrom c bzw. CAT-bindendes Protein präzipitiert.

Nur in der Mitochondrienfraktion konnte mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese neusynthetisiertes Cytochrom c nachgewiesen werden. Abb. 37 zeigt die Präzipitate aus den Mitochondrien nach 40 min in vitro Inkubation mit und ohne CCCP. Die Elektrophorese des Präzipitates aus den Mitochondrien des Kontrollansatzes zeigt an, daß Cytochrom c (bzw. das Apo-Protein; die Anwesenheit der Hämgruppe ist nicht untersucht worden) nach der Synthese in die Mitochondrien transportiert worden ist.

Wie in Abschnitt 3.2.2.3. gezeigt werden konnte, wird im in vitro-System in Gegenwart eines energieregenerierenden Systems die Protein-Synthese weder an den freien noch an den membrangebundenen Ribosomen der Mikrosomen durch CCCP gehemmt. Dagegen zeigt der Einbau von in vitro synthetisiertem Cytochrom c in die Mitochondrien eine Hemmung von 70 - 80 % (Abb. 37 B).

Für das CAT-bindende Protein betrug die Hemmung des Einbaus etwa 40 %. Die Labilität des CAT-Proteins gegenüber proteolytischen Angriffen bereitete Schwierigkeiten beim Nachweis von neusynthetisiertem CAT-Protein in den Mitochondrien nach Inkubation des Ansatzes bei 25° C für 40 min. Bisher konnte nur durch Präzipitation aus dem Gesamthomogenat die Synthese von CAT-bindendem Protein in vitro nachgewiesen werden. Dies gelang, indem der Antikörper bereits vor dem Lysieren des Homogenates zugegeben wurde. Abb. 38 zeigt die entsprechende Elektrophorese. Der Gipfel in den Fraktionen 24 - 28 stellt das CAT-Protein dar (Molekulargewicht: 32 000). Die Präzipitate aus den Mitochondrien zeigten eine Reihe von ^3H -markierten Proteinkomponenten im Molekular-

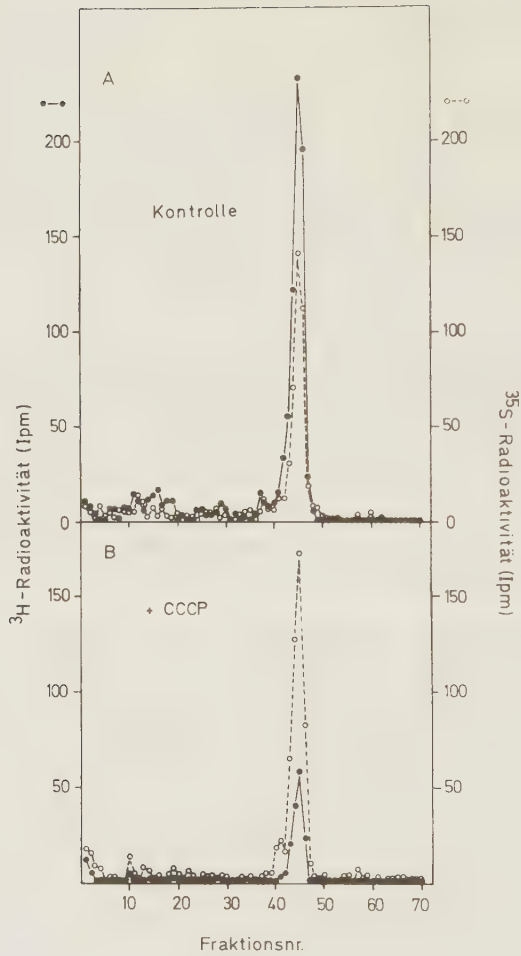


Abb. 37 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitiertem Cytochrom c aus Mitochondrien nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das gesamte Zellhomogenat.
A: Einbau von ^3H -Leucin ohne CCCP;
B: Einbau von ^3H -Leucin in Gegenwart von CCCP (25 μM);
•—•: ^3H -Leucin-Puls-Markierung;
o-----o: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

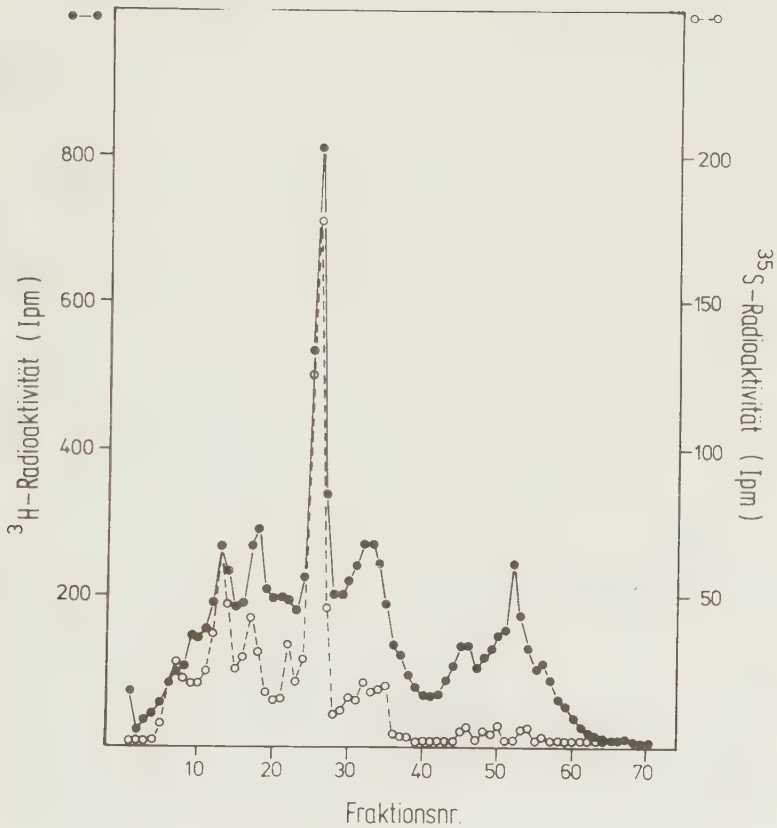


Abb. 38 Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitiertem CAT-bindendem Protein aus dem Zellhomogenat nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin für 40 min.

•—•—•: ^3H -Leucin-Einbau;
°-----°: homogene Markierung mit ^{35}S -Sulfat.

gewichtsbereich von 10 000 - 80 000. Der Nachweis von in vitro synthetisiertem CAT-Protein in den Mitochondrien ist daher nicht eindeutig gesichert.

3.3. Untersuchungen zur Lokalisierung des Translationsortes der chromosomal kodierten Mitochondrien-Proteine an freien oder membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen

Die in Kapitel 3.2. beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß sowohl in vivo als auch in vitro Mitochondrienproteine im extramitochondrialen Raum synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert werden. Eine Lokalisierung der extramitochondrialen Pools mitochondrialer Proteine war aus experimentellen Gründen nur beschränkt möglich. Im Falle der löslichen Matrixproteine erkannten die spezifischen Antikörper extramitochondriale Matrixpeptide vorwiegend im Cytosol. Durch die unvermeidliche Umverteilung von Proteinen während des Zellaufschlusses und der Fraktionierung war eine eindeutige Lokalisierung des extramitochondrialen Matrixpools nicht möglich. Mit spezifischen Antikörpern gegen das Cytochrom c und das CAT-bindende Protein konnten im extramitochondrialen Raum keine Polypeptide mit entsprechenden Molekulargewichten präzipitiert werden.

Daher wurde zunächst versucht, den Syntheseort der kernkodierten Mitochondrienproteine an freien bzw. membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen zu lokalisieren. Es wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt:

- a) die Untersuchung der pulsmarkierten naszierenden Peptidketten der freien und membrangebundenen Ribosomen,
- b) die Untersuchung der Translationsprodukte von isolierten Zellfraktionen in vitro.

3.3.1. Experimente zur immunologischen Identifizierung mitochondrienspezifischer Translationsprodukte an freien und membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen

Setzt man voraus, daß die spezifische Faltung von Proteinen bereits im naszierenden Zustand am Ribosom beginnt, dann kann erwartet werden, daß spezifische Antikörper in der Lage sind, die naszierenden Ketten am Ribosom zu erkennen. Da die Anzahl der Aminosäuren eines Proteins und damit die Länge seiner spezifi-

schen m-RNS die Größe des Polysoms bestimmt, an dem dieses Protein synthetisiert wird (104), sollte der Antikörper gegen ein bestimmtes Protein vorwiegend mit Polysomen bestimmter Größe in Wechselwirkung treten.

Die immunologische Identifizierung von naszierenden Ketten wurde in einer Reihe von Publikationen angewandt (siehe Übersichtsartikel: Rolleston (64)), um den Synthesort von Exportproteinen, wie z. B. von Serumalbumin und von Immunglobulinen nachzuweisen. Diese Experimente lieferten eine wichtige Stütze für die Hypothese, daß das rauhe endoplasmatische Retikulum in sekretorischen Zellen die Synthese von Exportproteinen übernimmt, während zelleigene Proteine an freien Ribosomen synthetisiert werden (64 - 67).

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden mit Antikörpern gegen die gesamten Matrixproteine durchgeführt. Neurospora-Kulturen wurden für 45 sec mit ^3H -Leucin pulsmarkiert. Diese kurze Markierung erlaubt vorzugsweise eine Markierung der naszierenden Ketten (105). Die Zellen wurden bei 0°C mit SAMT-Medium aufgeschlossen, anschließend wurden freie cytoplasmatische und membrangebundene cytoplasmatische Ribosomen isoliert (siehe 4.3.1. und 4.3.2.). Wie in Abschnitt 3.1. beschrieben wurde, enthalten Mitochondrien, die in magnesiumhaltigem Medium isoliert worden sind, einen erheblichen Anteil an membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen. Diese Ribosomen wurden für die Experimente eingesetzt. Auf die Mikrosomenfraktion wurde auf Grund der unvermeidlichen Kontamination durch freie Ribosomen verzichtet. Der post-mikrosomale Überstand und die Mitochondrien wurden mit Triton X-100 lysiert. In 2 h bei $165\,000 \times g$ wurden die Ribosomen abzentrifugiert.

Die aus dem postmikrosomalen Überstand gewonnenen Ribosomen werden als freie cytoplasmatische Ribosomen (c-Ribosomen), die aus den SAMT-Mitochondrien isolierten Ribosomen als cytoplasmatische membrangebundene plus mitochondriale Ribosomen ($c_m + m$ -Ribosomen) bezeichnet. Die beiden Ribosomenpräparationen wurden zunächst durch Zentrifugation über einen isokinetischen Dichtegradienten in ihre Untereinheiten, Mono- und Polysomen aufgetrennt und in Fraktionen zerlegt.

Vorversuche haben gezeigt, daß die Immunglobuline gegen die gesamte Matrix auch mitochondriale Ribosomen präzipitieren können. Das ist auf Grund der Methode zur Matrixisolierung erklärbar. Die Matrix wurde durch intensive Ultraschallbehandlung gewaschener Mitochondrien und anschließende Zentrifugation (2 h bei 165 000 x g) gewonnen (siehe 4.4.1.4.). Nach Experimenten von Michel (105) gelangt durch Ultraschallbehandlung ein großer Teil der mitochondrialen Ribosomen in den Matrix-Überstand. Zur Untersuchung der membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen (c_m -Ribosomen) war es daher notwendig, den mitochondrialen Anteil in den einzelnen Fraktionen mit Antikörpern gegen die mitochondrialen Ribosomen zu präzipitieren.

Die Überstände (entsprechend den c_m -Ribosomen) und die Fraktionen der aufgetrennten c-Ribosomen wurden mit Antikörpern gegen die Matrixproteine inkubiert. Um eine Vernetzung bzw. Präzipitation von Ribosomen mit naszierenden Matrix-Peptidketten zu gewährleisten, wurden alle Fraktionen anschließend mit unmarkierter Matrix versetzt und die Radioaktivität in den Präzipitaten bestimmt.

Folgendes Experiment ist in Abb. 39 dargestellt. 45 sec pulsmarkierte c_m + m- und c-Ribosomen (jeweils etwa 10 OD) wurden 2 h bei 286 000 x g durch einen isokinetischen Dichtegradienten zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen erhält man eine gute Auftrennung von Untereinheiten, von Mono- und Disomen. Die höheren Polysomen sind nach 2 h pelletiert. Aus den Fraktionen des c_m + m-Gradienten wurden die m-Ribosomen immunpräzipitiert und die Überstände (entsprechend den c_m -Ribosomen) mit Immunglobulinen gegen Matrixproteine und mit unmarkierter Matrix inkubiert. In gleicher Weise wurden die c-Ribosomen behandelt. Als Kontrolle wurde jeweils ein weiterer c_m - bzw. c-Ribosomen-Gradient mit Immunglobulinen von nicht immunisierten Kaninchen und unmarkierter Matrix inkubiert. Mit dieser Kontrolle kann der Anteil der Ribosomen erfaßt werden, der während der Präzipitationszeit unspezifisch, z. B. infolge von Aggregation, in das Immunpräzipitat gelangt.

In Abb. 39 A und B ist die Verteilung der Radioaktivität in den Immunpräzipitaten dargestellt. Aus Abb. 39 A ist ersichtlich,

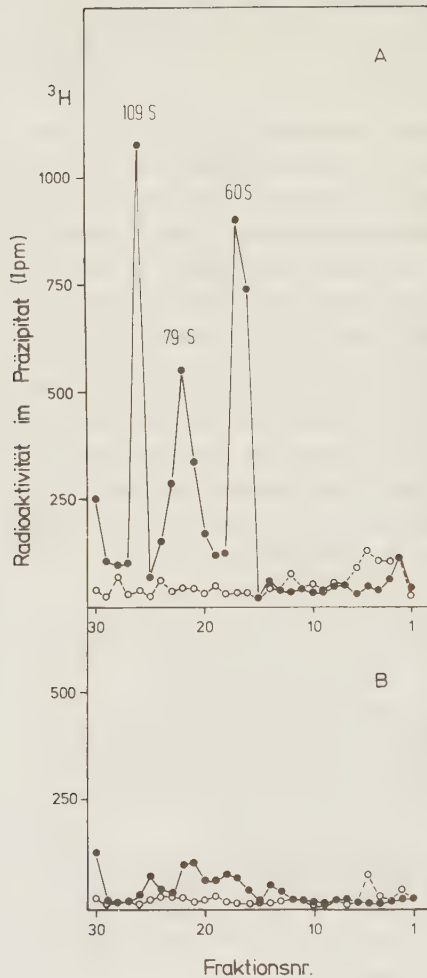


Abb. 39 Immunpräzipitation von ^3H -Leucin-pulsmarkierten freien und membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen nach Zentrifugation durch einen Saccharose-Dichtegradienten (2 h 286 000 $\times$ g).

A: membrangebundene cytoplasmatische Ribosomen;

B: freie cytoplasmatische Ribosomen;

•—•: Immunpräzipitation mit Immunglobulinen gegen Matrixproteine + Carrier-Matrix;

○—○: Kontrolle mit Immunglobulinen von einem nichtimmunisierten Kaninchen.

daß die Behandlung der membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen (c_m -Ribosomen) mit Antikörpern gegen Matrixproteine zu einer Präzipitation der großen Untereinheit (60-S), des Monosoms (79-S) und des Disoms (109-S) führt. Freie cytoplasmatische Ribosomen dagegen werden nicht präzipitiert (Abb. 39 B). Die Kontrolle mit Immunglobulinen von nicht immunisierten Kaninchen schließt eine unspezifische Sedimentation der membrangebundenen Ribosomen, z. B. durch größere Aggregationsneigung, aus. Diese scheinbar spezifische Präzipitation von membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen durch Antikörper gegen Matrixproteine und unmarkierte Carrier-Matrix erfordert den Nachweis der Spezifität durch weitere Kontrollexperimente.

Das beschriebene Experiment schließt nicht aus, daß bevorzugt die membrangebundenen Ribosomen unspezifisch mitgefällt werden.

Um dies zu überprüfen, wurden in einem weiteren Experiment alle Gradientenfraktionen mit Immunglobulinen gegen Rinder-Serumalbumin und Carrier-Rinder-Serumalbumin inkubiert und die Radioaktivität in den Immunpräzipitaten bestimmt. Nur eine derartig unabhängige Immunpräzipitation gibt Auskunft über die Spezifität der Bindung von Immunglobulinen gegen Matrix-Proteine mit Ribosomen. Zur Erfassung auch der höheren Polysomen wurden die Gradienten in diesem Experiment nur 65 min bei $286\,000 \times g$ zentrifugiert.

In Abb. 40 A sind die Verteilungen der Gesamtradioaktivitäten im Dichtegradienten von $c_m + m$ - und c_m -Ribosomen dargestellt. Abb. 40 B zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Präzipitat nach Inkubation mit Immunglobulinen gegen Matrixproteine und Carrier-Matrix. In Abb. 40 C ist die Radioaktivität im Immunpräzipitat in Prozent, bezogen auf die c_m -Ribosomen, wiedergegeben. Die Abb. 40 A', B', C' zeigen das entsprechende Kontrollexperiment mit Immunglobulinen gegen Rinder-Serumalbumin und Carrier-Rinder-Serumalbumin. Die Abb. 40 C und C' lassen erkennen, daß die Präzipitationen mit Immunglobulinen gegen Matrixproteine und Rinderserumalbumin in gleicher Weise zu einer unspezifischen Mitfällung der membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen führen. Mit steigender Größe der Polysomen nimmt der unspezifisch mitgefällte Anteil der c_m -Ribosomen im Präzipitat stark zu.

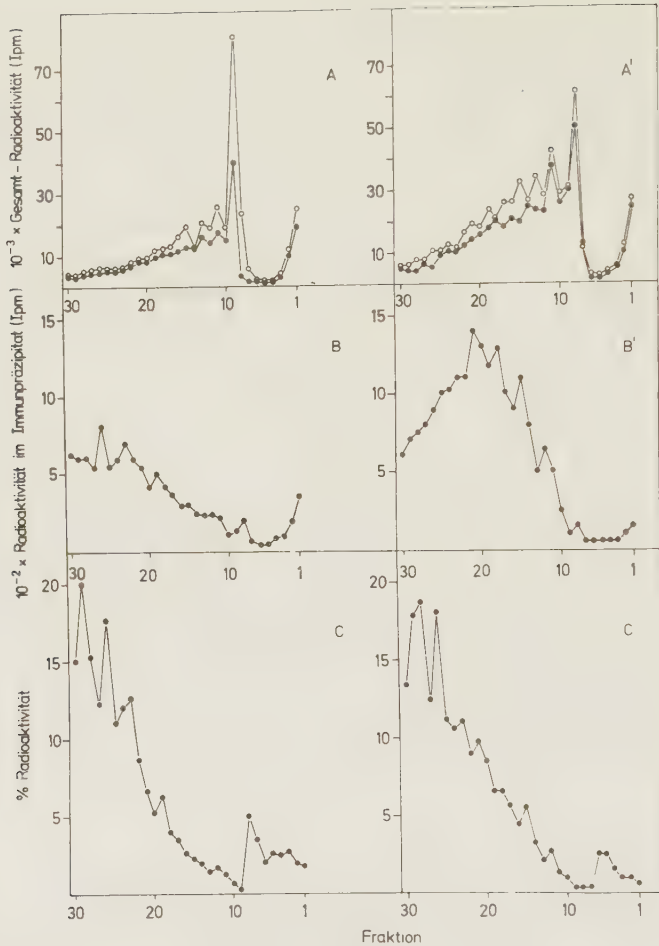


Abb. 40

Immunpräzipitation von ^3H -Leucin pulsmarkierten membrangebundenen Ribosomen nach Zentrifugation durch einen Saccharose-Dichtegradienten (65 min 286 000 x g).

- A: Verteilung der Gesamt- ^3H -Radioaktivität im Dichtegradienten;
 $\circ$ — $\circ$: $c_m + m$ -Ribosomen; $\bullet$ — $\bullet$: c -Ribosomen (Überstand nach Präzipitation mit Immunglobulinen gegen m -Ribosomen);
- B: ^3H -Radioaktivität, präzipitiert mit Immunglobulinen gegen Matrix-Proteine + Carrier-Matrix;
- C: $\% \text{ Radioaktivität}$ präzipitiert in B, bezogen auf Gesamt- c_m -Ribosomen;
- A': Verteilung der Gesamt- ^3H -Radioaktivität im Dichtegradienten, Symbole siehe A;
- B': ^3H -Radioaktivität, immunpräzipitiert mit Immunglobulinen gegen Rinder-Serumalbumin + Carrier-Rinder-Serumalbumin;
- C': $\% \text{ Radioaktivität}$ präzipitiert in B', bezogen auf Gesamt- c_m -Ribosomen.

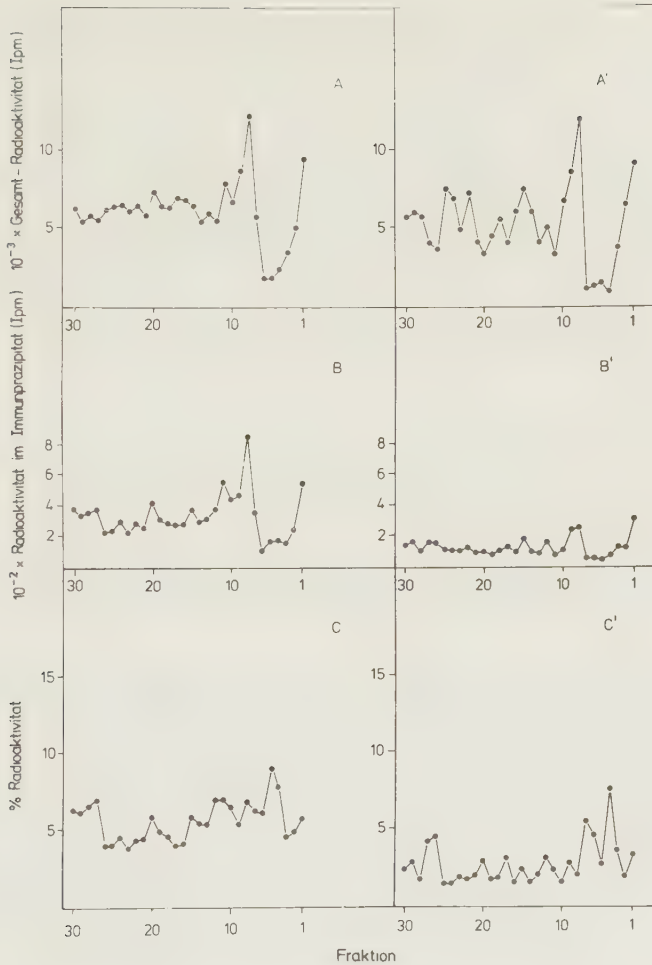


Abb. 41 Immunpräzipitation von ^3H -Leucin pulsmarkierten freien cytoplasmatischen Ribosomen nach Zentrifugation durch einen Saccharose-Dichtegradienten (65 min 286 000 x g).

- A: Verteilung der Gesamt- ^3H -Radioaktivität in Dichtegradienten;
 B: ^3H -Radioaktivität, präzipitiert mit Immunglobulinen gegen Matrix-Proteine + Carrier-Matrix;
 C: % Radioaktivität präzipitiert in B;
 A': Verteilung der Gesamt- ^3H -Radioaktivität im Dichtegradienten;
 B': ^3H -Radioaktivität, präzipitiert mit Immunglobulinen gegen Rinder-Serumalbumin + Carrier-Rinder-Serumalbumin;
 C': % Radioaktivität präzipitiert in B'.

Abb. 41 stellt das analoge Experiment mit freien cytoplasmatischen Ribosomen dar. Auch hier besteht kein wesentlicher Unterschied in der Radioaktivitätsverteilung der Immunpräzipitationen mit Immunglobulinen gegen Matrixproteine bzw. gegen Rinder-Serumalbumin. Die mit Antikörpern gegen Matrixproteine gefällten Anteile sind durchschnittlich um 2 bis 3 % höher als im Kontrollversuch (Abb. 41 C und C'). Dieser Differenzbetrag könnte als spezifisch präzipitiertes Material gedeutet werden, allerdings kann ein unterschiedlicher Grad der unspezifischen Mitfällung durch verschiedene Immunglobulin-Präparationen nicht ausgeschlossen werden.

Auffallend in Abb. 40 und 41 ist auch die unterschiedliche Verteilung des unspezifisch präzipitierten Materials aus c_m - und c-Ribosomen. Aus den Gradientenfraktionen aufgetrennter c-Ribosomen werden alle Polysomen durchschnittlich zu gleichen prozentualen Anteilen unspezifisch präzipitiert. Im Falle der membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen nimmt die Unspezifität mit der Größe der Polysomen stark zu.

Die unspezifische Präzipitation von Ribosomen wurde von Holme et al. (106, 107) auf eine unspezifische Bindung des nichtvariablen Anteils des IgG-Moleküls mit den Ribosomen zurückgeführt. Durch Abspaltung des nichtvariablen Anteils durch Pepsinbehandlung, d. h. durch Erzeugung von $F(ab')_2$ -Fragmenten konnte die Spezifität der Präzipitation erhöht werden.

Der Einsatz von $F(ab')_2$ -Fragmenten der Immunglobuline gegen Matrixproteine bzw. gegen Rinder-Serumalbumin führte unter den gewählten Bedingungen zu keiner Erhöhung der Spezifität.

3.3.2. Lokalisierung des Translationsortes von Mitochondrienproteinen durch in vitro-Proteinsynthese isolierter Zellfraktionen

Schließt man die Möglichkeit aus, daß kern-kodierte Mitochondrien-Proteine an Ribosomen synthetisiert werden, die an die mitochondriale Außenmembran gebunden sind (siehe 3.1. und 3.2.), so kommen zwei Translationsorte in Betracht:

- a) Synthese an freien cytoplasmatischen Ribosomen,
- b) Synthese an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums.

Gelingt es, in einem geeigneten zellfreien Proteinsynthesesystem der isolierten Zellfraktionen funktionelle Polypeptide zu synthetisieren, so sollte eine Zuordnung der Mitochondrienproteine zu einem der beiden Systeme möglich sein. Der Erfolg dieses experimentellen Ansatzes setzt voraus:

- a) die Intaktheit des ribosomalen Translationsapparates und die Anwesenheit aller notwendigen Faktoren;
- b) die Vermeidung von hydrolytischem Abbau der m-RNS durch Ribonukleasen;
- c) die Vermeidung von proteolytischem Abbau der Translationsprodukte;
- d) die Erkennung der in vitro synthetisierten Polypeptide durch spezifische Antikörper.

Zur in vitro-Proteinsynthese wurde ein von Rücker (96) ausgearbeitetes System verwendet (vgl. experimentellen Teil). Die Zellfraktionen in den folgenden Experimenten wurden nach Aufschluß der Zellen mit SAT-Medium isoliert (siehe 3.1.). Sie wurden nicht gewaschen, um die Isolierungszeiten möglichst kurz zu halten und damit eine zu starke Abnahme der Syntheserate zu vermeiden. Die Fraktionen wurden in 'Cytosol' resuspendiert, das aus Zellen gewonnen wurde, die mit Quarzsand und Inkubationsmedium bei 0° C aufgeschlossen worden waren (vgl. experimentellen Teil). Nach Zusatz eines energieregenerierenden Systems wurden die Ansätze mit ³H-Leucin inkubiert.

Der ³H-Leucin-Einbau in TCA-unlösliches Protein in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abb. 42 für die Mitochondrienfraktion, die Mikrosomenfraktion und die Ribosomenfraktion dargestellt. Die Einbauraten in den verschiedenen Zellfraktionen zeigte je nach Experiment relativ große Schwankungen. Aus Abb. 42 ist auch die Hemmbarkeit des ³H-Leucin-Einbaus in die Fraktionen durch CHI und CAP ersichtlich.

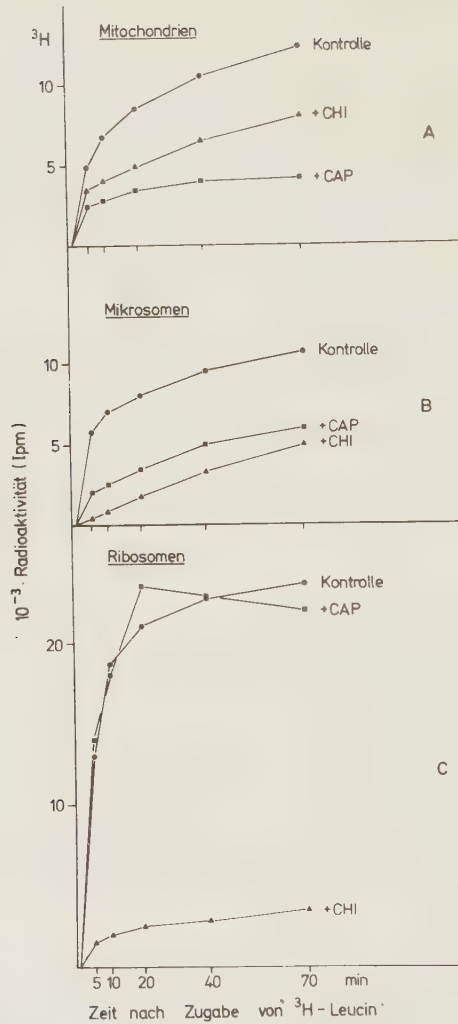


Abb. 42 In vitro-Einbau von ^3H -Leucin in isolierte Zellfraktionen und Hemmung des Einbaus durch CHI und CAP.

Demnach beträgt der Anteil der CHI-resistenten mitochondrialen Proteinsynthese in den ungewaschenen SAT-Mitochondrien (siehe 3.1.) etwa 65 %, der Rest entfällt auf die CAP-resistente cytoplasmatische Proteinsynthese (Abb. 42 A). Aus der Hemmung des Einbaus in die Mikrosomenfraktion durch CHI und CAP ergibt sich eine Kontamination der Mikrosomen durch Mitochondrien von etwa 47 % (Abb. 42 B). Die Proteinsynthese der Ribosomenfraktion wird durch CAP nicht, durch CHI dagegen sehr stark zu etwa 85 % gehemmt (Abb. 42 C).

Durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen die Matrixproteine, das Cytochrom c und das CAT-bindende Protein und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung des präzipitierten Materials waren in allen drei Fraktionen keine ^3H -markierten Polypeptide nachweisbar. Gründe hierfür sind in einer Nichterfüllung der obigen Voraussetzungen zu suchen. Weiterhin ist denkbar, daß die prozentualen Anteile der neusynthetisierten Proteine so klein sind, daß bei der erhaltenen Syntheserate die Radioaktivität im Präzipitat für eine elektrophoretische Identifizierung nicht ausreicht.

Für den Fall, daß die mitochondrialen Proteine während des Transports in die Mitochondrien einer wesentlichen Konformationsänderung unterliegen und dadurch eine Erkennung durch spezifische Antikörper nicht mehr möglich ist, bietet sich eine indirekte Identifizierung des Translationsortes von Mitochondrienproteinen an. Eine Rekonstitution des Synthese- und Transportsystems der mitochondrialen Proteine durch Kombination von isolierten Mikrosomen bzw. isolierten freien Ribosomen mit Mitochondrien und deren gemeinsame in vitro-Inkubation sollte nur in einer der beiden Kombinationen neusynthetisierte, bereits in die Mitochondrien integrierte Proteine immunologisch nachweisen lassen.

In Abb. 43 A ist der Einbau von ^3H -Leucin in verschiedene Systeme durch das Verhältnis der ^3H -Leucin-Radioaktivität zur ^{35}S -Sulfat-Radioaktivität der homogenen Markierung ausgedrückt. Dargestellt sind folgende Systeme:

- a) Mikrosomen;
- b) freie cytoplasmatische Ribosomen;

c) Mitochondrien + Mikrosomen;

d) Mitochondrien + freie cytoplasmatische Ribosomen.

In c) und d) wurde nach 5 min ein Leucin-Chase zugegeben.

In diesem Experiment erreicht der Einbau in die Mikrosomen ein $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis von über 10,0, während das Verhältnis in den freien cytoplasmatischen Ribosomen nur einen Wert von 2,5 erreicht. Durch Kombination der Ribosomen mit Mitochondrien kommt es vermutlich infolge der mitochondrialen Proteinsynthese zu einer Erhöhung des Einbaus auf ein Verhältnis von 3,0. Werden die Mikrosomen zusammen mit Mitochondrien mit ^3H -Leucin inkubiert, so ergibt sich ein, verglichen mit den Mikrosomen, niedriges $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis von etwa 4,0. Dies erklärt sich aus der Erhöhung der ^{35}S -Radioaktivität durch Zugabe der Mitochondrien. Der Leucin-Chase bewirkt in beiden Fällen einen sofortigen Einbaustopp.

Betrachtet man nach anschließender Reisolierung der Zellfraktionen deren ^3H -Leucin-Einbau, so fällt die charakteristische Markierungskinetik der Mikrosomen auf (Abb. 43 B). Verglichen mit der Kinetik von isolierten Mikrosomen erhält man durch Inkubation von Mikrosomen in Gegenwart von Mitochondrien einen steilen Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses, das nach 15 min ein Maximum durchläuft und anschließend wieder abfällt. Auch nach Zugabe des Leucin-Chase sinkt das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis deutlich ab. Die Mitochondrien zeigen einen langsamen Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses, das nach 30 min einen konstanten Wert erreicht. Nach Chase-Zugabe erfolgt ebenfalls noch ein deutlicher Anstieg des Verhältnisses. Da der Chase auch den mitochondrialen Einbau stoppt, ist dieser Anstieg dem Einbau von ^3H -Leucin-markierten Polypeptidketten in die Mitochondrien zuzuschreiben.

Nach Reisolierung der Mitochondrien und Mikrosomen findet man im Überstand eine Markierungskinetik, die der von freien cytoplasmatischen Ribosomen sehr ähnlich ist. Nach 10 - 15 min ist der Einbau beendet.

Das Abfallen des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses in der Mikrosomenfraktion nach Chase-Zugabe und das gleichzeitige Ansteigen des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses in den Mitochondrien nach Chase-Zugabe bei kon-

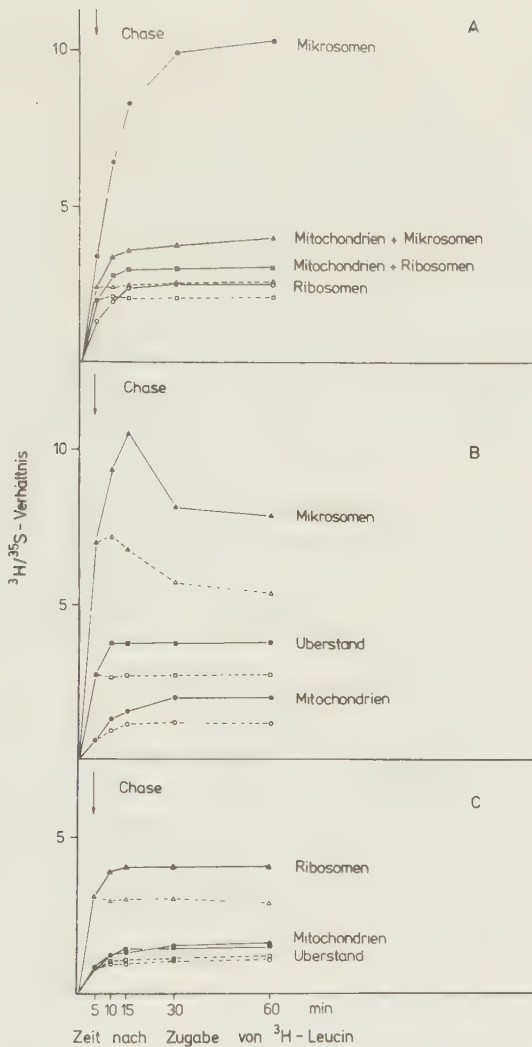


Abb. 43 In vitro-Einbau von ^3H -Leucin in isolierte Mikrosomen und Ribosomen in Gegenwart und in Abwesenheit von Mitochondrien.

— : ^3H -Leucin-Einbau; - - - : ^3H -Leucin-Einbau nach Chase-Zugabe;

Die homogene Markierung erfolgte mit ^{35}S -Sulfat. Der Einbau von ^3H -Leucin ist als $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis dargestellt.

A: Gesamt- ^3H -Leucin-Einbau in TCA-unlösliches Protein;

B: Einbau in die Mitochondrien, die Mikrosomen und den postmikrosomalen Überstand nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das System Mitochondrien + Mikrosomen;

C: Einbau in die Mitochondrien, die Ribosomen und den postribosomalen Überstand nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das System Mitochondrien + Ribosomen.

stantem Verhältnis im Überstand nach Chase-Zugabe entspricht den Ergebnissen, die durch Einbau von ^3H -Leucin in vivo in ganze Zellen und in vitro in das Zellhomogenat erhalten wurden (siehe 3.2.). Somit wird auch für ein zellfreies System, das nur Mitochondrien und Mikrosomen enthält, eine Synthese von Polypeptiden in der Mikrosomenfraktion und ihr anschließender Transport in die Mitochondrien wahrscheinlich gemacht.

Das System, das nur Mitochondrien und freie cytoplasmatische Ribosomen enthält (Abb. 43 C), zeigt einen schnellen Anstieg des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses in den reisolierten Ribosomen; nach Chase-Zugabe beobachtet man einen leichten Abfall des Verhältnisses. Das Verschwinden von ^3H -markierten Peptidketten in der Ribosomenfraktion muß mit einem entsprechenden Anstieg des Verhältnisses im Überstand oder den Mitochondrien korrelieren. Nach Chase-Zugabe zeigt der Überstand einen etwa vergleichbaren Anstieg. In der Mitochondrienfraktion erhält man nur einen geringfügigen Anstieg des Verhältnisses nach Chase-Zugabe. Die neu-synthetisierten Ketten werden offenbar zum Teil in den löslichen Überstand abgegeben.

Auch in diesem Versuch wurde aus allen Fraktionen mit spezifischen Antikörpern gegen Matrixproteine, gegen Cytochrom c und gegen das CAT-bindende Protein präzipitiert. In allen Fällen war die Radioaktivität in den Immunpräzipitaten für eine gelelektrophoretische Identifizierung zu gering. Damit kann keine Aussage über den Transport von bestimmten Proteinen in die Mitochondrien gemacht werden. Abschließend ergibt sich die Notwendigkeit einer Verbesserung des zellfreien Systems für die isolierten Zellfraktionen.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Züchtung von *Neurospora* und homogene Markierung des Zell-Proteins mit radioaktiven Aminosäuren bzw. ^{35}S -Sulfat

Hyphen von *Neurospora crassa* (Wildtyp 74A) wurden in Vogel's Minimalmedium (2 % Saccharose) unter steriler Belüftung bei 25°C gezüchtet. Die Inokulation erfolgte mit 2×10^6 Konidien pro Milliliter Zuchtmedium. Die Hyphen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase nach 16 - 18 Stunden geerntet. Hierzu wurde der Inhalt der Zuchtflaschen mit Eiswasser auf 0°C abgekühlt, über eine Nutsche filtriert und mit kaltem Isolierungsmedium gewaschen.

Zur homogenen Markierung des Zellproteins mit radioaktiven Aminosäuren wurde den Kulturen 14 Stunden nach der Inokulation ^3H -Leucin (40 - 60 Ci/mMol in 0,01 N HCl-Lösung) oder ^{14}C -Leucin (270 mCi/mMol in 0,01 N HCl-Lösung) zugesetzt. Nach weiteren 2 - 4 h wurden die Zellen geerntet.

Zur Markierung des Zellproteins mit ^{35}S -Sulfat wurden die Hyphen in sulfatarmem Vogel's Minimalmedium (0,081 mM MgSO_4) gezüchtet. ^{35}S -Sulfat (10 - 1 000 mCi/mMol in H_2O) wurde bei der Inokulation zugegeben. Für die in Kapitel 3.2. beschriebenen in vivo- und in vitro-Experimente wurden die *Neurospora*-Kulturen 2 h vor dem Ernten mit einem Sulfat-Chase versetzt (Endkonzentration: 1 mM MgSO_4).

4.2. Zellaufschluß und Fraktionierung

4.2.1. Zellaufschluß und Fraktionierung zur Isolierung von Ribosomen (siehe 3.1.1. und 3.3.)

Die Hyphen aus 1 - 4 l Kulturen (Ausbeute: 5 - 10 g Feuchtgewicht pro Liter Ansatz) wurden mit dem 5fachen Volumen Isolierungsmedium (bezogen auf das Feuchtgewicht) 30 sec lang in einem Braun-Mixer homogenisiert.

Verwendete Isolierungsmedien (vgl. 3.1.1.1.):

SET-Medium (= SE_{1,0}T-Medium): 0,44 M Saccharose, 1 mM EDTA,
30 mM Tris-HCl, pH 7,6

SE_{0,1}T-Medium: 0,44 M Saccharose, 0,1 mM EDTA,
30 mM Tris-HCl, pH 7,6

SAMT-Medium: 0,44 M Saccharose, 0,1 M NH₄Cl,
10 mM MgCl₂, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6

Die homogenisierten Hyphen wurden in einer von Weiß et al. (75) beschriebenen Zelmühle bei 4° C aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Material wurde folgendermaßen zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor-Typ SS-34): 10 min 1 500 x g, der Überstand 5 min 2 500 x g. Aus dem Überstand der zweiten Zentrifugation wurden die Mitochondrien in 12 min bei 17 300 x g sedimentiert. Waschen der Mitochondrien: Das Mitochondrienpellet wurde im entsprechenden Isolierungsmedium resuspendiert und nochmals 12 min bei 17 300 x g abzentrifugiert.

Zur Isolierung der cytoplasmatischen Ribosomen wurden die Zellen mit SAMT-Medium aufgeschlossen und der post-mitochondriale Überstand 20 min bei 27 000 x g zentrifugiert. Aus dem resultierenden Überstand wurden die cytoplasmatischen Ribosomen gewonnen (4.3.1.).

4.2.2. Zellaufschluß und Fraktionierung nach Pulse- und Pulse-Chase-Markierung ganzer Zellen

Aliquote von Pulse- und Pulse-Chase markierten Kulturen (50 - 200 ml) wurden zu den jeweils angegebenen Zeiten (vgl. 3.2.1.) mit Eiswasser auf 0° C abgekühlt und auf einer vorgekühlten Nutsche möglichst rasch abgesaugt. Die Hyphen (etwa 0,5 - 1,0 g Feuchtgewicht) wurden bei - 6° C mit etwa dem 5fachen Volumen SAT-Medium (0,5 M Saccharose, 5 mM NH_4Cl , 30 mM Tris-HCl, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 7,4) 30 sec lang mit einem Ultraturrax homogenisiert und sofort mit einer Zelmühle nach Weiß et al. (75) aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Material wurde 2 x 5 min 2 000 x g zentrifugiert. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde als 'Homogenat' bezeichnet.

Von diesem Homogenat wurde jeweils 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäßen fraktioniert. Die Mitochondrien wurden in 12 min bei 17 300 x g sedimentiert und durch Resuspendieren und Rezentrifugieren (12 min 17 300 x g) in 1 ml SET-Medium (0,44 M Saccharose, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7,6) gewaschen. Aus dem post-mitochondrialen Überstand wurde die Mikrosomenfraktion in 30 min bei 48 000 x g abzentrifugiert. Das Mikrosomenpellet wurde einmal mit SAT-Medium (1 ml) gewaschen.

Der postmikrosomale Überstand wurde 2 Stunden bei 165 000 x g zentrifugiert. Das Sediment (freie Ribosomen und leichte Membranen) wurde keiner weiteren Reinigung unterzogen. Der resultierende Überstand wurde als 'Cytosol' bezeichnet.

4.2.3. Zellaufschluß und Fraktionierung für in vitro-Markierungsexperimente mit dem Zellhomogenat

Für in vitro-Markierungsexperimente wurden die Hyphen mit einem von Rücker et al. (68) beschriebenen Inkubationsmedium aufgeschlossen. Das Inkubationsmedium enthielt:

30 mM KCl, 150 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 ,
20 mM KH_2PO_4 , 4 mM ATP, 60 mM TRA-HCl, 30 mM TRA, ferner 0,25 mM aller L-Aminosäuren außer Leucin. Der pH-Wert wurde auf 7,85 mit KOH eingestellt.

5 g Hyphen (Feuchtgewicht) wurden mit 7,5 g Quarzsand und 2,5 ml Inkubationsmedium durch intensives Reiben mit Mörser und Pistill bei 0° C in ca. 5 min aufgeschlossen. Der Aufschluß wurde mit weiteren 7,5 ml Inkubationsmedium verdünnt und homogenisiert. Anschließend wurde zweimal 5 min bei 2 000 x g zentrifugiert. Der Überstand ('Homogenat') wurde für die Inkubation mit ³H-Leucin eingesetzt (siehe 4.6.).

4.2.4. Zellaufschluß und Fraktionierung für in vitro-Markierungsexperimente mit isolierten Zellfraktionen

Für in vitro-Markierungsexperimente mit isolierten Zellfraktionen wurden die Hyphen, wie in 4.2.3. beschrieben, mit Sand aufgeschlossen. Anstelle des Inkubationsmediums wurde SAT-Medium (0,5 M Saccharose, 5 mM NH₄Cl, 30 mM Tris-HCl, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 7,4) für den Aufschluß verwendet.

Aus dem in 4.2.3. beschriebenen 'Homogenat' wurde durch Zentrifugation 2 h bei 165 000 x g der cytoplasmatische Überstand gewonnen. In diesem durch Aufschluß von Zellen mit Inkubationsmedium erhaltenen cytoplasmatischen Überstand wurden die Zellfraktionen suspendiert und für die ³H-Leucin-Inkubation eingesetzt.

4.3. Isolierung und Analyse von Ribosomen (siehe 3.1.1.)

4.3.1. Isolierung von cytoplasmatischen Ribosomen

Zur Gewinnung von cytoplasmatischen Ribosomen wurden die Hyphen mit SAMT-Medium (vgl. 4.2.1.) aufgeschlossen. Der postmitochondriale Überstand wurde 20 min bei 27 000 x g zentrifugiert (vgl. 4.2.1.). Der resultierende Überstand wurde mit Triton X-100 (Endkonzentration 2 %) versetzt und zur Abtrennung nicht lysierter Partikel 20 min 22 000 x g zentrifugiert. Der so hergestellte Überstand wurde über ein 48 %iges Saccharose-Kissen in AMT (100 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 30 mM Tris-HCl, pH 7,6) geschichtet und 2 h bei 165 000 x g zentrifugiert. Die glasklaren Ribosomenpellets wurden in AMT suspendiert und durch Zentrifugation in einer Misco-Tischzentrifuge von größeren Partikeln befreit. Von der Ribosomensuspension im Überstand wurde das UV-Spektrum registriert.

4.3.2. Isolierung von Ribosomen aus Mitochondrienfraktionen

Die gewaschenen Mitochondrienfraktionen (vgl. 4.2.1.) wurden in AMT-Puffer (100 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 30 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 - 2 mg Protein/ml AMT-Puffer) resuspendiert und durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 2 %) in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel bei 0° C lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation 20 min bei 22 000 x g von nichtlysierten Partikeln befreit und über ein Saccharose-Kissen (48 % Saccharose in AMT) geschichtet. Die Ribosomen wurden in 2 h bei 165 000 x g sedimentiert und nach Absaugen des Überstandes und Abspülen des Pellets durch vorsichtiges Schwenken in AMT suspendiert. Nach Zentrifugation in einer Misco-Tischzentrifuge wurde vom Überstand die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt.

4.3.3. Ribosomenisolierung in Gegenwart von Heparin

Zur Untersuchung der Wirkung von Heparin auf das Sedimentationsverhalten der Ribosomen (vgl. 3.1.1.3.) enthielten alle verwendeten Medien Heparin in einer Konzentration von 0,5 mg/ml.

4.3.4. Isolierung von E. coli-Ribosomen

Ribosomen aus E. coli B wurden nach der Methode von Spirin et al. (108) präpariert. Zwecks radioaktiver Markierung wurden E. coli-Kulturen während der logarithmischen Wachstumsphase mit 0,001 mCi ^3H -Leucin/ml Kultur für 3 h inkubiert.

4.3.5. Gradientenzentrifugation von Ribosomen

Zur Auftrennung der Ribosomen (zwischen 2 und 10 OD_{260}) wurde ein konvexer Saccharosegradient nach Noll (109) verwendet: Gradientenvolumen 11 ml, 10 ml Vorlage einer 10,25 %igen Saccharose in AMT, Reservoir 48 %ige Saccharose in AMT. Die Zentrifugation erfolgte in einem Beckman-Spinco-Rotor SW 41 bei 286 000 x g und 1° C für 1 - 2 h. Der Gradient wurde durch Anstechen mit einer Kanüle mit einer 60 %igen Saccharoselösung ausgepumpt und in 30 Fraktionen zerlegt. Dabei wurde die Absorption bei 260 nm im Durchfluß gemessen.

Die Einheit der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) ist diejenige Menge an Ribosomen, die bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 1 ergibt (1 OD entspricht etwa 0,04 - 0,05 mg Ribosomen).

4.3.6. Immunpräzipitation von mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomen

Zur quantitativen Immunpräzipitation von Ribosomen wurden etwa 2 OD_{260} in 1 ml 1 % Triton X-100 in AMT mit 0,1 - 0,2 ml spezifischem Antiserum versetzt. Nach 15 h bei 4° C wurden die Immunpräzipitate in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und zweimal mit je 1 ml 1 % Triton X-100 in AMT gewaschen.

Die gewaschenen Immunpräzipitate wurden in 0,2 ml 1 % SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 gelöst (15 h bei 4° C) und die Radioaktivität bestimmt.

Aus Fraktionen der Dichtegradienten (0,2 - 0,4 ml) wurde nach Zusatz von 1 ml 1 % Triton X-100 in AMT mit 0,1 - 0,2 ml Antiserum präzipitiert.

4.3.7. Extraktion und Auftrennung der Nukleinsäuren

Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte nach der von Leaver und Ingle (110) beschriebenen Methode. Zur Isolierung der RNS aus Mitochondrienfraktionen wurden diese bei 20 - 25° C in Extraktionsmedium (siehe unten) aufgenommen und dadurch lysiert (Protein-Konzentration: 5 - 10 mg/ml). Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand mit 4 Volumina Phenolreagenz nach Kirby (111) bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Phenolphase von der wässrigen Phase durch Zentrifugation getrennt. Nach Abtrennen der oberen phenolischen Phase wurde die Extraktion der wässrigen Phase dreimal wiederholt. Die wässrige Phase wurde schließlich zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1, v/v) ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Phase wurde dann die RNS durch Zugabe von 2 Volumina absoluten Äthanolis ausgefällt und abzentrifugiert. Die getrockneten RNS-Pellets wurden in 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,2 aufgenommen. Die RNS-Gehalte der resultierenden Lösungen wurden aus der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Extraktionsmedium: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 6 % p-Aminosalicylsäure, 1 % Tri-isopropylnaphtalin-sulfonsäure (TNS), pH 9,0. Um TNS in Lösung zu halten wurden noch einige Tropfen Phenolreagenz zugegeben.

Phenolreagenz: 500 g Phenol wurden durch Ausschütteln mit 200 ml 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, gewaschen. Die Phenolphase wurde abgetrennt und mit 75 ml destilliertem m-Kresol und 0,5 g 8-Hydroxychinolin versetzt. Der pH-Wert wurde auf pH 9,0 eingestellt.

Die Isolierung cytosolischer RNS erfolgte durch Extraktion des postmitochondrialen Überstandes.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNS erfolgte nach der Methode von Loening (112). Die Auftrennung der hochmolekularen

RNS-Spezies wurde auf 2,4 %igen Polyacrylamid-Gelen in 2,5 h bei 50 V (6 mA/8 cm Gel) durchgeführt. Die Gele wurden mit einem Gilford Spektrophotometer bei 260 nm densitometriert. Zur Reinigung der Gele wurde bereits vor dem Auftragen der Proben für 30 min elektrophoretisiert. Die Molekulargewichte wurden durch Koelektrophorese von ribosomaler RNS aus *E. coli* (Molekulargewichte: $1,1 \times 10^6$ und $0,56 \times 10^6$) bestimmt. Die RNS-Spezies mit niedrigen Molekulargewichten wurden auf 7,5 %igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und densitometriert.

4.4. Immunpräzipitation aus solubilisierten Zellfraktionen

4.4.1. Herstellung der Antigene aus Neurospora

4.4.1.1. Isolierung von mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomen

Zur Herstellung größerer Mengen mitochondrialer und cytoplasmatischer Ribosomen für die Immunisierung wurde die in 4.3.1. und 4.3.2. beschriebene Ribosomenisolierung abgewandelt.

Mitochondriale Ribosomen: 4 x 8 l Neurospora-Kulturen wurden zunächst mit 32 g Chloramphenicol/8 l Ansatz für 1 h inkubiert und anschließend geerntet (Ausbeute: etwa 500 g Hyphen, Feuchtwicht). Chloramphenicol wurde gelöst in Äthanol/Wasser (1/1) zugegeben. Die Hyphen wurden in 2,5 l SET-Medium mit der Zelmühle aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Material wurde zunächst in einem GS-3 Rotor (Sorvall-Zentrifuge RC 2B) zentrifugiert: 15 min 2 250 x g, die Überstände 5 min 3 700 x g. Die Überstände der zweiten Zentrifugation wurden 1 h 14 700 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden in 320 ml SET-Medium resuspendiert und in einem SS 34-Rotor (Sorvall-Zentrifuge RC 2B) erst 5 min 3 700 x g, die Überstände 12 min 17 300 x g zentrifugiert. Die pelletierten Mitochondrien wurden nochmals in 320 ml SET-Medium resuspendiert und 5 min 3 700 x g und 12 min 17 300 x g zentrifugiert.

Die zweimal gewaschenen Mitochondrienpellets wurden in 320 ml AMT suspendiert und mit Triton X-100 (Endkonzentration 2 %) lysiert. Nach einer Reinigungszentrifugation 20 min 22 000 x g wurden aus dem Lysat in 2 h bei 78 000 x g (Rotor 30, Beckman-Spinco-Zentrifuge) die Ribosomen ohne Saccharose-Kissen sedimentiert. Die pelletierten Rohribosomen wurden in etwa 100 ml AMT suspendiert und nochmals mit Triton X-100 (Endkonzentration 4 %) lysiert. Nach einer weiteren Reinigungszentrifugation 20 min bei 22 000 x g wurde das Lysat über 2 ml 48 % Saccharose-Kissen geschichtet und 2 h 165 000 x g (Beckman-Spinco-Zentrifuge, Rotor 50 Ti) zentrifugiert. Die Ribosomenpellets wurden 2 - 3 ml AMT suspendiert und in einer Misco-Tischzentrifuge

von größeren Partikeln befreit. Der Überstand wurde zur Immunisierung eingesetzt (vgl. 4.4.2.). Ribosomenausbeute: etwa 160 OD₂₆₀.

Cytoplasmatische Ribosomen: Der Zellaufschluß erfolgte in diesem Fall mit SE_{0,1}T-Medium (vgl. 4.2.1.). Das aufgeschlossene Material wurde zweimal 20 min 27 000 x g zentrifugiert. Aus den Überständen wurden die Ribosomen direkt in 2 h bei 78 000 x g (Rotor 30, Beckman-Spinco-Zentrifuge) sedimentiert. Die Ribosomenpellets wurden in AMT suspendiert und mit Triton X-100 (Endkonzentration 2 %) versetzt. Nach Zentrifugation 20 min bei 22 000 x g wurden die klaren Überstände über 2 ml 48 % Saccharosekissen zentrifugiert (2 h 165 000 x g, Beckman-Spinco-Zentrifuge, Rotor 50 Ti). Die Ribosomenpellets wurden in wenig AMT suspendiert und zur Immunisierung eingesetzt (vgl. 4.4.2.).

4.4.1.2. Isolierung von Cytochrom c

Cytochrom c von *Neurospora crassa* wurde in Abwandlung der von Heller und Smith (102) beschriebenen Methode folgendermaßen isoliert: 3 kg mit flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Hyphen wurden in einer French-Press aufgeschlossen und in ca. 2 l destilliertem Wasser homogenisiert. Das Homogenat wurde zur Extraktion von Cytochrom c mit konz. NH₃ auf pH 10,0 eingestellt und ca. 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Eisessig auf pH 8,5 eingestellt und 1 h 14 700 x g zentrifugiert (GS-3-Rotor, Sorvall-Zentrifuge RC 2B). Der Überstand wurde zur Verringerung der Ionenstärke auf ca. 75 l mit destilliertem Wasser verdünnt. Dann wurden ca. 30 g Bio-Rex 70 (Kationenaustauscher, min. 400 mesh) eingerührt. Der Ionenaustauscher wurde vorher mit 0,1 N Ammoniumphosphat-Puffer, pH 7,0 äquilibriert. Nach ca. 15 h Rühren wurde der Ionenaustauscher abgenutscht und das Filtrat verworfen. Der rötlich gefärbte Austauscher wurde in 0,1 N Ammoniumphosphat, pH 7,0 aufgenommen und ca. 10 min gerührt. Daraufhin wurde nochmals abgenutscht und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen.

Der gewaschene Austauscher mit gebundenem Cytochrom c wurde in

0,1 N Ammoniumphosphat-Puffer, pH 7,0 suspendiert und auf eine vorbereitete Bio-Rex 70-Säule aufgeschichtet (3,4 x 11 cm, äquilibriert mit 0,1 N Ammoniumphosphat, pH 7,0). Die Säule wurde mit 100 ml 0,1 N und anschließend mit 0,2 N Ammoniumphosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen. Der 0,1 N Puffer enthielt einige Kristalle Kaliumhexacyanoferrat (III), um evtl. reduziert vorliegendes Cytochrom c zu oxidieren. Schließlich wurde das Cytochrom c mit 0,5 N Ammoniumphosphat, pH 7,0 eluiert. Die Cytochrom c-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und gegen Wasser dialysiert.

Die entsalzte Cytochrom c-Lösung wurde lyophilisiert und in wenig 0,1 N Ammoniumphosphat, pH 7,0 aufgenommen. Diese konzentrierte Lösung wurde auf eine Sephadex G-50 Säule (fine, 80 - 20 μ , äquilibriert mit 0,1 N Ammoniumphosphat, pH 7,0, 4 x 55 cm) aufgetragen und mit 0,1 N Ammoniumphosphat-Puffer eluiert.

Die Reinheit der eluierten Cytochrom c-Fraktionen wurde durch SDS-Gelelektrophorese und durch Bestimmung des Extinktionsverhältnisses der reduzierten Form bei 550 nm zur oxidierten Form bei 280 nm kontrolliert. Heller und Smith (102) geben für gereinigtes Cytochrom c aus Neurospora ein Verhältnis von 1,2 an. Die gereinigten Cytochrom c-Fraktionen (Extinktionsverhältnis: 1,35) wurden für die Immunisierung verwendet.

4.4.1.3. Isolierung von Carboxyatractylosid-bindendem Protein (CAT-bindendes Protein)

Die Isolierung des CAT-bindenden Proteins wurde nach einer von Prof. M. Klingenberg freundlicherweise zur Verfügung gestellten Vorschrift durchgeführt.

Hyphen aus 4 x 8,1-Kulturen wurden mit 0,3 M Saccharose, 0,05 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 6,8 aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Material wurde zunächst in einem GS-3-Rotor (Sorvall-Zentrifuge RC 2B) 15 min 2 250 x g, die Überstände 5 min 3 700 x g zentrifugiert. Die Überstände der zweiten Zentrifugation wurden 1 h bei 9 000 rpm (14 700 x g) zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden nochmals in obigem Medium resuspendiert und

in einem SS-34 Rotor (Sorvall-Zentrifuge RC 2B) erst 5 min 2 500 x g, die Überstände 12 min 17 300 x g zentrifugiert.

Die einmal gewaschenen Mitochondrien wurden zu einer Konzentration von 10 mg Protein/ml in 0,3 M Saccharose, 10 mM MOPS, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,05 mM EDTA, pH 6,8 suspendiert. Diese Mitochondriensuspension wurde mit 1,2 μ Mol CAT/g Protein unter Rühren 30 min lang bei 4° C inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde 30 min 48 000 x g zentrifugiert und die Pellets in 100 ml 4,4 % Triton X-100, 110 mM NaCl, 20 mM MOPS, pH 7,2 lysiert. Nach 30 min Stehen bei 0° C wurde das Lysat 60 min 60 000 x g zentrifugiert (Rotor 50 Ti, Beckman-Spinco-Zentrifuge).

Die Überstände wurden auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen (Säulenvolumen 80 ml, 20 - 30 g Bio Gel HTP, äquibriert mit 0,5 % Triton X-100, 10 mM MOPS, 50 mM NaCl, pH 7,2). Die Säule wurde mit 0,5 % Triton X-100, 10 mM MOPS, 50 mM NaCl, pH 7,2 eluiert. Das CAT-bindende Protein erscheint mit dem Durchlauf in Form einer gelblichen Lösung. Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese. Die von Verunreinigungen freien Fraktionen wurden direkt zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Proteinbestimmungen nach Lowry wurden in Gegenwart von 0,5 % SDS durchgeführt.

4.4.1.4. Isolierung der mitochondrialen Matrix

Mitochondriale Matrix wurde aus zweimal gewaschenen SET-Mitochondrien präpariert. Die Mitochondrien wurden in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 8,0 suspendiert und 10 x 30 sec mit einem Branson-Sonifier (Modell S 75) bei Stufe 5 unter Kühlung beschallt. Die Membranen wurden erst 20 min 39 000 x g, der Überstand nochmals 2 h 165 000 x g zentrifugiert. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde als mitochondriale Matrix zur Immunisierung verwendet.

4.4.2. Immunisierung von Kaninchen

Die Antigen-Präparationen (vgl. 4.4.1.) wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Injektionskanüle mit Freund's Adjuvans (Difco, Detroit, Michigan) im Verhältnis 1 : 1 (v/v) homogenisiert. Die Emulsionen wurden in Kaninchen subkutan injiziert. Die Injektionen erfolgten viermal im Abstand von 8 - 10 Tagen. Pro Injektion wurden folgende Mengen verabreicht:

Cytoplasmatische Ribosomen	3 - 5 mg (60 - 100 OD ₂₆₀)
Mitochondriale Ribosomen	1 - 3 mg (20 - 60 OD ₂₆₀)
Cytochrom c	2 - 5 mg
CAT-bindendes Protein	1 - 3 mg
Mitochondriale Matrix	5 - 10 mg
Rinder-Serumalbumin	4 - 10 mg

4.4.3. Gewinnung von Antiseren und Immunglobulinen

8 - 10 Tage nach der letzten Injektion wurde den Kaninchen 100 - 120 ml Blut aus den Ohrvenen entnommen. Zur Gerinnung wurde das Blut ca. 10 h bei 4° C in Zentrifugengläsern aufbewahrt. Der Cruor wurde abzentrifugiert und die Überstände zur Entfernung von restlichen Erythrozyten nochmals 15 min 48 000 x g zentrifugiert. Die Seren wurden bei - 18° C aufbewahrt.

Ammoniumsulfat-Fällung der Immunglobuline:

10 ml Serum wurden mit 10 ml 0,9 % NaCl gemischt und unter Rühren 13,3 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (mit NH₃ auf pH 7,2 eingestellt) zugefügt. Ammoniumsulfat-Sättigung: 40 %.

Nach 20 min Stehen bei 4° C wurde 10 min 8 000 x g zentrifugiert. Die pelletierten Immunglobuline wurden in jeweils 1 ml AMT bzw. 0,3 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gelöst und 10 - 15 h gegen AMT bzw. 0,3 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 dialysiert. Diese dialysierten Immunglobulinfractionen wurden ohne weitere Reinigung für die Immunpräzipitationen verwendet.

4.4.4. Titerbestimmung der Antisera und Immunglobulin-Präparationen

Zur Titerbestimmung wurden entweder je 20 - 50 µg der isolierten Antigene oder 200 - 300 µg ³⁵S-markiertes Mitochondrienprotein mit je 1 ml AMT (für Ribosomenpräzipitationen) oder mit 0,3 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 verdünnt. Nach Zusatz von Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) und Zentrifugation 15 min bei 48 000 x g wurden die Ansätze mit steigenden Mengen Antiserum oder Immunglobulin-Präparation (20 - 500 µl) versetzt. Nach 15 h bei 4° C wurden die Immunpräzipitate abzentrifugiert, gewaschen und die Radioaktivität bestimmt (vgl. 4.4.5.).

4.4.5. Immunpräzipitation aus solubilisierten Zellfraktionen

Die pelletierten Zellfraktionen wurden in 1 ml 0,3 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 resuspendiert; der cytosolische Überstand (0,5 ml) wurde mit 0,5 ml 0,6 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 versetzt. Im Falle der Präzipitation mit Antikörpern gegen CAT-bindendes Protein wurde anstelle eines pH-Wertes von 7,5 ein Wert von 6,5 verwendet. Außerdem enthielt das Medium 1 mM p-Chloromercuribenzoat. Alle Proben wurden mit 50 µl 20 % Triton X-100 in 0,3 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Endkonzentration 1 %) lysiert. Zu allen nichtmitochondrialen Fraktionen wurden unmarkierte Mitochondrien (200 µg Protein) als Carrier zugesetzt. Nach Abzentrifugieren von nichtlysiertem Material (15 min 48 000 x g) wurden die Überstände mit einer dem jeweiligen Titer entsprechenden Menge Immunglobulin inkubiert.

Nach Präzipitation bei 4° C in 15 h wurden die Proben in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Präzipitate wurden zweimal mit je 1 ml 1 % Triton, 0,3 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 und anschließend dreimal mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 gewaschen. Die gewaschenen Immunpräzipitate wurden in 40 µl 1 % SDS, 0,1 M Tris-HCl, 2,5 % Mercaptoäthanol (v/v), pH 8,0 gelöst (ca. 15 h bei 4° C) und die Radioaktivität aus einem Aliquot bestimmt (vgl. 4.9.4.).

4.4.6. Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese der Immunpräzipitate

Die in 1 % SDS gelösten Immunpräzipitate wurden in einer Konzentration von 50 - 150 µg Protein/20 µl auf 15 %ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Die Gele wurden aus folgenden Lösungen hergestellt:

1. 12 g Acrylamid, 320 g Bisacrylamid, 100 µl Tetramethyläthylen-diamin, ad 60 ml Wasser;
2. 100 mg Ammoniumperoxodisulfat ad 20 ml Wasser.

Die beiden Lösungen wurden bei 0° C gemischt und dann in zerlegbare Kunststoff-Formen (2 x 75 x 150 mm) gegossen, in welchen Auftragsspalten (Volumen 20 µl) vorgeformt waren. Nach Polymerisation (ca. 1 h) wurden die Gele mindestens 24 h mit Elektrophorese-Puffer (0,5 % SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0) äquilibriert.

Die aufgetragenen Proben wurden zunächst bei einer Feldstärke von 5 Volt/cm elektrophoretisiert. Nach dem Einwandern der Proteine (ca. 1 h) wurde die Feldstärke auf 15 Volt/cm erhöht. Die Gele wurden während der Elektrophorese beidseitig gekühlt (12° C). Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den Gelen siehe 4.9.4..

Die Eichung der Gele nach Molekulargewichten erfolgte durch Parallelelektrophorese von Eichproteinen (Rinderserumalbumin, Lactatdehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Lactoglobulin a, Cytochrom c und Glucagon). Die Proteinbanden wurden mit 0,25 % Coomassie-Brilliant-Blue in Methanol/Wasser/Eisessig (5 : 5 : 1, v/v/v) angefärbt; entfärbt wurde mit dem gleichen Lösungsmittel (ca. 40 h).

4.5. Pulse- und Pulse-Chase-Markierung von ganzen Zellen

Homogen mit ^{35}S -Sulfat markierte *Neurospora*-Kulturen wurden 2 h vor dem ^3H -Leucin-Puls auf 8°C abgekühlt. Nach Zugabe von ^3H -Leucin zum Zeitpunkt 0 min wurde die Kultur geteilt und während der Pulsmarkierungsdauer auf 8°C gehalten. Zu den in 3.2.1. jeweils angegebenen Zeiten wurden die Teilkulturen mit unmarkiertem Leucin (Chase), mit CCCP oder CHI versetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquote jeder Teilkultur sofort mit Eiswasser auf 0°C abgekühlt und aufgeschlossen (vgl. 4.2.2.).

Verwendete Konzentrationen:

Leucin-Chase: 1,31 mg/ml (10 mM);

CCCP: 1 $\mu\text{g/ml}$, gelöst in Äthanol zugegeben;

CHI: 0,1 mg/ml.

4.6. In vitro-Proteinsynthese im Zellhomogenat

Zu einem ml des nach 4.2.3. hergestellten Zellhomogenates wurden zur Energieversorgung des Systems zugegeben:

20 μ l GTP (0,5 mM);
20 μ l ATP (0,5 mM);
10 μ l Kreatinkinase (50 μ g/ml);
3,6 g Kreatinphosphat

Dieser Ansatz wurde bei 25° C mit 0,5 ml, entsprechend 0,5 mCi, 3 H-Leucin inkubiert. Aliquote des Ansatzes wurden mit einem Leucin-Chase (1,31 mg/ml) bzw. mit CCCP (5 μ g/ml) versetzt. Aus den Inkubationsansätzen wurden zu den in 3.2.2. angegebenen Zeiten Aliquote entnommen und entweder direkt zur Radioaktivitätsbestimmung auf TCA-imprägnierte Glasfaserfilter pipettiert (20 - 50 μ l (vgl. 4.9.4.)) oder mit Eis auf 0° C abgekühlt. Die auf 0° C gekühlten Aliquote wurden wie in 4.2.2. beschrieben fraktioniert.

4.7. In vitro-Proteinsynthese in isolierten Zellfraktionen

Die isolierten Zellfraktionen wurden in 1 ml des nach 4.2.4. hergestellten cytoplasmatischen Überstandes resuspendiert und wie in 4.6. beschrieben mit ATP, GTP, Kreatinkinase, Kreatinphosphat und ^3H -Leucin bei 25°C inkubiert. Die in den Experimenten verwendeten Konzentrationen betrugen für: CHI 0,1 mg/ml; CAP 1 mg/ml; Leucin-Chase 1,31 mg/ml.

4.8. Elektronenmikroskopie

Proben für die Elektronenmikroskopie wurden erst pelletiert und mit 3 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,4 für 6 - 12 h fixiert. Die Pellets wurden dann 3mal mit 0,29 M Saccharose, 0,2 M Cacodylat-Puffer, pH 7,4 gewaschen und in 1 % OsO_4 für 1 h in 0,29 M Saccharose, 10 mM MgCl_2 , 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2 nachfixiert. Die Proben wurden in Äthanol entwässert und in Epon 812 eingebettet. Dünnschnitte wurden mit einem LKB Ultratom III angefertigt und mit 7 % Magnesium-Uranyl-Acetat und Bleicitrat kontrastiert.

4.9. Bestimmungsmethoden

4.9.1. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Biuretmethode in der Modifikation von Beisenherz et al. (113) oder nach der Methode von Lowry et al. (114) bestimmt.

4.9.2. RNS-Bestimmung

Zur RNS-Bestimmung wurden Aliquote der zu untersuchenden Proben mit kalter HClO_4 (Endkonzentration 0,2 N) gefällt, zweimal mit 0,2 N HClO_4 gewaschen und mit 0,2 N HClO_4 durch 10 min Erhitzen auf 90° C hydrolysiert. Im Überstand der folgenden Zentrifugation wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Hochmolekulare RNS aus Hefe wurde als Standard verwendet.

In Ribosomensuspensionen wurden die RNS-Gehalte durch direkte Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (1 OD_{260} entspricht etwa 40 - 50 μg Ribosomen).

4.9.3. Enzym- und Cytochrombestimmungen

Succinat-Cytochrom c-Reduktase (SDH) wurde nach der Methode von Arrigoni und Singer (116) in folgendem Testmedium bestimmt: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, 1 mM EDTA, 1 mM KCN, 0,1 mM Cytochrom c, 0,15 mM Phenazinmethosulfat, 25 mM Succinat, pH 7,6. Die Reduktion des Cytochrom c wurde bei 550 nm in einem Beckman-DK 1A-Spektrophotometer verfolgt, indem gegen eine Referenzküvette gemessen wurde, die kein Substrat enthielt. Testtemperatur: 25° C.

NADPH-Cytochrom c-Reduktase wurde im gleichen Medium wie der SDH-Test bestimmt. Substrat war hier 0,1 mM NADPH. Testtemperatur: 25° C.

Die Cytochrom c-Konzentration wurde aus Differenzspektren (oxidiert gegen reduziert) bestimmt. Extinktionkoeffizient für Cytochrom c bei 550 nm: $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (102).

4.9.4. Radioaktivitätsmessung

Die Messung der Radioaktivitäten erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer vom Typ Tricarb der Fa. Packard Instruments. Als Szintillationsflüssigkeit diente eine Lösung von 6 g Szinti-Mix I (Packard Instruments) in 600 ml Toluol und 400 ml 2-Methoxyäthanol. Die Zählausbeuten betrugen bei alleiniger Zählung von ^3H ca. 30 %, von ^{14}C und ^{35}S ca. 40 %.

Zur Messung der in das Protein eingebauten Radioaktivitäten wurden Aliquote der Zellhomogenate und Zellfraktionen auf Whatman-Glasfaserfilter (Durchmesser 2,5 cm) pipettiert, die mit 10 % TCA-Äther imprägniert waren. Die Glasfaserfilter wurden wie folgt gewaschen: zweimal 3 min mit 5 % TCA bei Raumtemperatur, einmal 10 min mit 5 % TCA bei 90° C, zweimal 3 min mit 5 % TCA bei Raumtemperatur, zweimal mit Äther/Äthanol (1 : 1) und einmal mit Äther. Die Filter wurden dann getrocknet und mit 0,5 ml SDS-haltigem Puffer in Szintillations-Zählgläschen bei 60° C eine Stunde lang eluiert. Nach Zugabe von 12 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität gemessen.

Aliquote der in SDS gelösten Immunpräzipitate wurden direkt in 12 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und ausgezählt.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den Gelen wurden diese in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten. Die Gelscheibchen wurden in 0,5 ml Elektrophorese-Puffer 12 Stunden bei 60° C im Szintillations-Zählgläschen eluiert. Nach Auffüllen mit Szintillationsflüssigkeit (12 ml) wurde die Radioaktivität gemessen.

4.10. Verwendete Materialien

^3H -Leucin (40 - 60 Ci/mMol in 0,01 N HCl, ^{14}C -Leucin (270 mCi/mMol), ^{35}S -Sulfat (10 - 1 000 mCi/mMol): NEN, New England Nuclear Chemicals GmbH.

Cycloheximid: Carl Roth; Karlsruhe.

ATP; GTP; LDH; BSA; TIM; Cytochrom c (aus Pferdeherz); Creatinphosphat; Creatin-Kinase; Carboxyatractylosid (CAT): Boehringer; Mannheim.

SDS; Coomassie-Blue; Acrylamid; Bisacrylamid; Tetramethyläthylen-diamin; Heparin-Na; 2-Mercaptoäthanol; Phenazin Methosulfat; p-Chloromercuribenzoessäure, Na-Salz; Triisopropylnaphtalin-Sulfonsäure: Serva GmbH; Heidelberg.

Triton X-100; Morpholinopropansulfonsäure (MOPS); Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP): Sigma Chemicals Co.; St.Louis, U.S.A..

Quarzsand; Trichloressigsäure: Riedel-De Haen AG; Seelze; Hannover.

Saccharose; Tris-HCl; EDTA; Phenol; p-Aminosalicylsäure; 8-Hydroxychinolin; Salze und sonstige Lösungsmittel (p.a.): Merck AG; Darmstadt.

Freund's Adjuvans: Difco; Detroit; Michigan; U.S.A..

Scinti-Mix I: Packard Instruments; Frankfurt.

Chloramphenicol: Bayer AG; Leverkusen.

2-Methoxyäthanol: Farbwerke Hoechst AG; Gendorf.

Toluol: ARAL AG; Ingolstadt.

Hydroxylapatit; (Bio-Gel HTP; Bio-Rex 70 (minus 400 mesh; Na-Form)): Bio Rad Laboratories; Richmond; Californien; U.S.A..

Sephadex G-50; fine: Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala; Schweden.

5. DISKUSSION

Das Organisationsprinzip der Kompartimentierung der eukaryotischen Zelle in membranumschlossene Reaktionsräume erfordert zelluläre Mechanismen des Transports von Proteinen zunächst durch Zellmembranen und schließlich zu ihren funktionellen Wirkungs-orten im extrazellulären Raum, in den Membranen selbst oder in Zellorganellen wie Lysosomen, Peroxisomen, Glyoxysomen, Chloroplasten und Mitochondrien. Bis auf die wenigen Proteine, die vom Mitochondrien- bzw. Chloroplasten-spezifischen Proteinsynthesystem geliefert werden, ist der Translationsort aller Proteine, also auch der Matrixproteine von Zellorganellen, im Cytoplasma lokalisiert.

Die Erforschung des Transports von Proteinen vom Ort ihrer Synthese bis zu ihrem funktionellen Wirkungsort läßt sich in verschiedene Teilaspekte aufgliedern:

- a) Syntheseort an freien oder membrangebundenen Ribosomen;
- b) Wechselwirkung von neusynthetisierten Polypeptidketten und eventuell von messenger-RNS-Molekülen mit der Membran;
- c) Mechanismus der Translokation durch die Membran;
- d) weitere Transportmechanismen nach Translokation des Proteins durch die Membran zu ihrem funktionellen Wirkungsort; mögliche generelle Funktion des endoplasmatischen Retikulums für den intrazellulären Proteintransport, z. B. Proteintransport in den Membranen des Retikulums selbst im Sinne des von Singer und Nicolson (116) postulierten dynamischen Membranmodells, Transport im Lumen des Retikulums und Transport durch Membranfusionen oder Vesikelbildung.

In diesem Sinne stellt das in dieser Arbeit angesprochene Problem des Transports cytoplasmatisch synthetisierter Proteine in die Mitochondrien nicht nur einen wesentlichen Teilaspekt der Mitochondrienbiogenese dar, sondern vielmehr ein generelles Problem des Transports von Proteinen und somit auch der Biogenese von Zellorganellen und Zellmembranen.

Diese zellulären Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Genauere Untersuchungen liegen bisher nur für den Export von Proteinen in sekretorischen Zellen vor (Übersicht siehe (65)). Demnach werden Exportproteine an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und gelangen durch vektorielle Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Von hier aus erfolgt der weitere Transport über den Golgi-Apparat und Sekretgranula zur Zellmembran. Diese Membranbarriere wird durch Membranfusion überwunden. Die molekularen Grundlagen und die treibenden Kräfte dieses Proteintransports sind ebenfalls noch wenig erforscht.

Neben dem Export von Proteinen aus der Zelle ist auch der Import von Proteinen durch die Plasmamembran bekannt. Dieser Prozeß ist vor allem an Oozyten nachgewiesen worden. Durch Invaginationen der Plasmamembran und Abschnüren von Vesikeln werden Serumproteine, vor allem IgG-Moleküle, spezifisch in die Oozyten transportiert. Dieser Transport unterliegt einer hormonellen Regulation (117).

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse über den Transport von Proteinen können Vorstellungen über mögliche Mechanismen für den Transport von Proteinen in die Mitochondrien entwickelt werden. Allerdings muß man angesichts der geringen Information und der besonderen Struktur der Mitochondrien - der Begrenzung durch zwei verschiedene Membranen - weitere Mechanismen durchaus in Betracht ziehen.

Nach bisherigen Untersuchungen besitzt die mitochondriale Innenmembran nur eine sehr begrenzte Permeabilität auch für niedermolekulare Komponenten. Diese Moleküle werden vorwiegend durch in der Membran lokalisierte Carrier-Proteine gegen einen Konzentrationgradienten durch die Membran transportiert. Demgegenüber scheint die mitochondriale Außenmembran frei permeabel zu sein für viele Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von etwa 10 000 (118). Für eine Durchlässigkeit der Außenmembran für Proteine gibt es bisher keine Anhaltspunkte. Nach Untersuchungen von Wojtczak et al. (119, 120) ist die Außenmembran für Cytochrom c mit einem Molekulargewicht von ca. 13 500 be-

reits impermeabel. Somit stellt sich für den Transport von Proteinen in die Mitochondrien das spezielle Problem der Überwindung von zwei Membranen.

Auf der Basis dieser Überlegungen erscheinen folgende prinzipiell mögliche Mechanismen denkbar (Abb. 44):

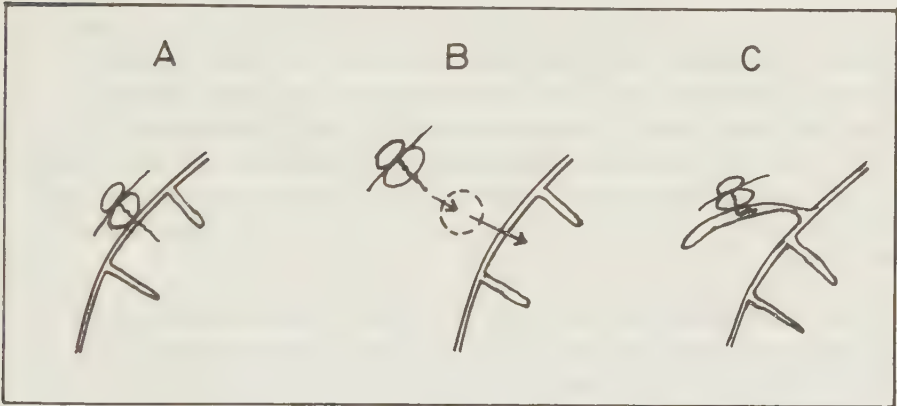


Abb. 44 Vereinfachte Modelle für den Transport cytoplasmatisch synthetisierter Proteine in die Mitochondrien.

- A: Der Transport erfolgt durch direkte Kopplung von Translation und vektorieller Translokation durch Außenmembran-gebundene Ribosomen.
- B: Translation und Transport in die Mitochondrien sind nicht gekoppelt, d. h. die an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisierten Peptidketten durchlaufen nach ihrer Ablösung von den Ribosomen einen extramitochondrialen Vorstufen-Pool, ehe sie in die Mitochondrien gelangen. Dieses Modell schließt sowohl eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums als auch einen Transport über gelöste Vorstufen im Cytosol ein.
- C: Als drittes Modell bietet sich ein Kontinuum zwischen der mitochondrialen Außenmembran und den Membranen des endoplasmatischen Retikulums an. Auch hier sind Synthese und Transport nicht gekoppelt. Bezogen auf die mitochondriale Innenmembran ist der von den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, der Außenmembran und der Innenmembran umschlossene Raum in gewisser Hinsicht als extramitochondrial zu betrachten. Dieses Modell erfordert einen weiteren Translokationsmechanismus durch die mitochondriale Innenmembran.

Angeichts der dargelegten Möglichkeiten stellt sich zunächst die Aufgabe, Experimente zu planen und durchzuführen, die eine Diskriminierung zwischen den verschiedenen Modellen erlauben.

5.1. Mögliche Aussagen über den Mechanismus des Transports auf der Basis von in vivo- und in vitro-Pulsmarkierungs-Experimenten

Die Modelle B und C lassen ähnliche kinetische Eigenschaften erwarten, d. h. nach Pulsmarkierung von Zellen mit radioaktiven Aminosäuren sollte der Einbau von neusynthetisierten Polypeptiden in die Mitochondrien verglichen mit dem Einbau in das Cytosol eine Verzögerung aufweisen. Dagegen werden in Modell A die naszierenden Ketten von mitochondrialen Proteinen in gleicher Weise direkt an die Mitochondrien abgegeben wie die naszierenden Ketten von cytosolischen Proteinen in das Cytosol.

Weitere experimentelle Möglichkeiten zur Differenzierung zwischen dem Modell A und den Modellen B oder C liefert der Einsatz von Cycloheximid, einem Hemmstoff, der die cytoplasmatische Proteinsynthese blockiert. Nach Modell A sollte nach Blockierung der cytoplasmatischen Translation auch der Einbau von neusynthetisierten Proteinen in die Mitochondrien sofort blockiert werden, während in den Modellen B und C der extramitochondriale Pool für einen weiteren Einbau zur Verfügung steht.

Weiterhin kann ausschließlich in den Modellen B und C der experimentelle Nachweis von extramitochondrialen Vorstufen erwartet werden. Für Modell C gilt dies insofern, als man mit einer artefiziellen Ablösung des endoplasmatischen Retikulums von der Außenmembran während der Zellfraktionierung rechnen muß.

5.1.1. Kinetik des Erscheinens neusynthetisierter Peptidketten in den Mitochondrien

Wie bereits angedeutet, darf nach Modell A - unter der Voraussetzung gleicher Syntheseraten für alle Proteine - erwartet werden, daß neusynthetisierte Proteine im Cytosol und in den Mitochondrien mit annähernd gleicher Markierungskinetik erscheinen, weiterhin sollten auch verschiedene Mitochondrienproteine mit gleicher Kinetik in den Mitochondrien erscheinen.

Bei Zwischenschaltung extramitochondrialer Vorstufen-Pools (Modelle B und C) ist eine gegenüber dem Cytosol verzögerte Markierungskinetik zu erwarten. Unterschiedlich große extramitochondriale Pools sollten auch zu unterschiedlichen, charakteristischen Einbaukinetiken der verschiedenen Mitochondrienproteine führen.

Wesentlich für die Entdeckung solcher Markierungsunterschiede bei in vivo-Pulsmarkierungsexperimenten ist die Wahl einer geeigneten Versuchstemperatur. Bei 25° C ist der Einbau von radioaktivem Leucin in die Mitochondrien innerhalb weniger Sekunden abgeschlossen. Erst eine Verlangsamung der Synthese- und Transportprozesse durch Erniedrigung der Temperatur ergibt die Möglichkeit einer Differenzierung der Einbaukinetiken hinsichtlich der nach den Modellen B oder C geforderten Charakteristika.

Die in dieser Arbeit beschriebene Puls- und Puls-Chase-Markierung von Neurospora-Zellen mit ^3H -Leucin wurde bei 8 - 9° C durchgeführt. Der Einbau von ^3H -Leucin in das Gesamt-Protein der Mitochondrien und in verschiedene durch Immunpräzipitation identifizierte Mitochondrienproteine weist die für die Modelle B oder C erwarteten Markierungseigenschaften auf. Dies ist der Fall auch nach Zugabe eines Leucin-Chase.

Da der Leucin-Chase den weiteren ^3H -Leucin-Einbau in die Translationsprodukte von cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen in gleicher Weise praktisch sofort stoppt (96), kann eine Beteiligung der mitochondrialen Proteinsynthese am Einbau ausgeschlossen werden. Der beobachtete, verglichen mit dem Cytosol, wesentlich langsamere ^3H -Leucin-Einbau in die Mitochondrien nach

dem Chase berechtigt zu der Annahme, daß cytoplasmatisch synthetisierte Polypeptide nach ihrer Ablösung von den Ribosomen aus einem extramitochondrialen Vorstufen-Pool in die Mitochondrien eingebaut werden.

Unterschiedliche Markierungsgeschwindigkeiten konnten nachgewiesen werden für das CAT-bindende Protein, das als ADP/ATP-Translokator in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert ist (100, 101), für das Cytochrom c (bzw. das Apo-Cytochrom c), das an der Außenseite der Innenmembran lokalisiert ist (97, 98, 99), für die im Matrixraum bzw. an der Innenseite der Innenmembran befindlichen mitochondrialen Ribosomenproteine (45, 121) und für die gesamten Matrixproteine. Die elektrophoretische Analyse der immunpräzipitierten Matrixproteine zeigte auch für verschiedene Matrixproteinkomponenten unterschiedliche Markierungsgeschwindigkeiten in den Mitochondrien.

Das CAT-bindende Protein und das Cytochrom c, die beide in der Innenmembran lokalisiert sind, zeigen, verglichen mit den mitochondrialen Ribosomenproteinen und den Matrixproteinen, eine größere Markierungsgeschwindigkeit. Die Kinetik für Cytochrom c weist außerdem eine gegenüber dem CAT-bindenden Protein ausgeprägtere lag-Phase auf. Dies kann mit der möglichen Existenz immunologisch nicht erfaßbarer intramitochondrialer Vorstufen (z. B. Apo-Cytochrom c) in Zusammenhang gebracht werden.

Bemerkenswert ist weiterhin, daß von den 6 elektrophoretisch aufgetrennten Matrixproteinkomponenten diejenigen mit Molekulargewichten von ca. 40 000 - 80 000 langsamer markiert werden als die Komponenten mit Molekulargewichten von ca. 20 000 - 40 000.

Ein anderes experimentelles System zur Untersuchung von Synthese und Transport cytoplasmatisch synthetisierter Proteine in die Mitochondrien liefert das in dieser Arbeit beschriebene zellfreie Proteinsynthesystem im Zellhomogenat. Auch in diesem System weisen die Zellfraktionen nach Einbau von ^3H -Leucin ein dem in vivo-System sehr ähnliches Markierungsverhalten auf. Die Markierungskinetik der Mitochondrien zeigt ebenfalls einen verzögerten Einbau neusynthetisierter Polypeptide verglichen mit dem Einbau in das Cytosol. Weiterhin können in den Mitochondrien-

fraktionen ^3H -Leucin markierte und damit in vitro neusynthetisierte Matrixproteine und Cytochrom c (bzw. Apo-Cytochrom c) immunologisch nachgewiesen werden. Diese Befunde deuten darauf hin, daß das Transportsystem auch nach Aufschluß der Zellen im Zellhomogenat funktionsfähig geblieben ist.

Nach den vorliegenden Experimenten kann allerdings eine unspezifische Bindung neusynthetisierter Polypeptide an die Mitochondrien nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Das sehr ähnliche Markierungsverhalten der Zellfraktionen im in vivo- und in vitro-System macht jedoch ein intaktes Transportsystem im zellfreien System wahrscheinlich. Auch durch Berücksichtigung der Kontamination von Mitochondrien durch Mikrosomen wird die Markierungskinetik der Mitochondrien in den in vivo- und in vitro-Experimenten nicht wesentlich verändert. In beiden Systemen war die Kontamination der Mitochondrien durch Mikrosomen niedriger als 10 %.

Der Einbau neusynthetisierter Polypeptide in die Mitochondrien wird sowohl in vivo als auch in vitro durch Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) auch nach Chase-Zugabe stark gehemmt. Der Einbau in das Cytosol, in die Ribosomenfraktion und in die Mikrosomenfraktion wird dagegen insbesondere im in vitro-System nur wenig verändert. Da CCCP auch als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung wirkt, ist das in vitro-System für die Untersuchung des CCCP-Effektes besser geeignet. In diesem Fall sorgt ein energie-regenerierendes System für die Aufrechterhaltung energieverbrauchender Prozesse und damit für die Aufrechterhaltung der Proteinsynthese. Die Befunde lassen erkennen, daß der Transport durch CCCP unabhängig von der Synthese beeinflußt werden kann. Sie liefern somit ein weiteres Argument für das Modell B oder C. Eine Aussage über die Energieabhängigkeit des Transportprozesses ist auf der Basis dieser Experimente nicht möglich.

5.1.2. Blockierung der Translation durch Cycloheximid

Die Blockierung der cytoplasmatischen Translation durch Cycloheximid bietet eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung zwischen dem Modell A und den Modellen B oder C. Voraussetzung hierfür ist, daß Cycloheximid nicht nur die Translation an freien sondern auch an membrangebundenen Ribosomen blockiert. Experimentelle Hinweise für die Blockierung auch der Proteinsynthese an membrangebundenen Ribosomen liefert die in vitro-Proteinsynthese mit isolierten freien und mikrosomengebundenen Ribosomen in Gegenwart von Cycloheximid.

Bei direkter Kopplung von Translation und Translokation (Modell A) sollte nach ^3H -Leucin-Pulsmarkierung in vivo die Einwirkung von Cycloheximid zu einem sofortigen Blockieren des weiteren Einbaus neusynthetisierter Polypeptidketten in die Mitochondrien führen. Die Experimente zeigen dagegen auch nach gleichzeitiger Chase- und Cycloheximid-Zugabe den Einbau von ^3H -markierten Polypeptiden an. Die Chase-Zugabe schließt dabei einen Einbau von ^3H -Leucin in TCA-unlösliche Polypeptide durch das mitochondriale Proteinsynthesystem aus (96).

Nach in vivo-Pulsmarkierungsexperimenten von Zimmermann (103) ist der Einbau von ^3H -Leucin-markierten Polypeptiden in die Mitochondrien nach Zusatz von Cycloheximid und eines Leucin-Chase verglichen mit alleiniger Chase-Zugabe um 60 - 70 % (je nach Pulsdauer) vermindert. Diese Befunde erlauben eine grobe Abschätzung des Anteils mitochondrien-spezifischer naszierender Peptidketten an cytoplasmatischen Ribosomen am gesamten extramitochondrialen Pool mitochondrialer Proteine. Von der gesamten ^3H -Radioaktivität in mitochondrien-spezifischen extramitochondrialen Polypeptidketten liegen demnach etwa 30 - 40 % in Form abgelöster fertiger Peptidketten vor. Sie sind auch nach Blockierung der Translation für den Transport verfügbar, d. h. Synthese und Transport sind nicht gekoppelt.

5.1.3. Vorstufen-Pools von cytoplasmatisch synthetisierten Mitochondrienproteinen im extramitochondrialen Raum

Eine weitere Stütze für einen Transport nach den Modellen B oder C liefert der direkte Nachweis extramitochondrialer Pools mitochondrialer Proteine. Durch immunologische Identifizierung konnten neusynthetisierte Matrixproteine nach ^3H -Leucin-Pulsmarkierung mit einer typischen Precursor-Produkt-Kinetik im Cytosol nachgewiesen werden. Nach vorläufigen Ergebnissen sind extramitochondriale Pools auch von Untereinheiten der Cytochromoxidase immunologisch nachweisbar. Demnach kommt die Untereinheit 5 vorwiegend im Cytosol, die Untereinheit 6 vorwiegend in der Mikrosomenfraktion vor. Für das CAT-bindende Protein und das Cytochrom c konnten keine extramitochondrialen Pools identifiziert werden. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist die Unfähigkeit der verwendeten Antikörper neusynthetisiertes Cytochrom c (bzw. Apo-Cytochrom c) und CAT-bindendes Protein zu erkennen.

Wesentlich für die Erfassung extramitochondrialer Pools in Neurospora ist die Möglichkeit der Doppelmarkierung, d. h. homogene Markierung des Zellproteins mit ^{35}S -Sulfat und Pulsmarkierung mit ^3H -Leucin. Dadurch ist es möglich, zwischen alten, bereits zu Beginn der Pulsmarkierung in die Mitochondrien integrierten ^{35}S -markierten Matrixproteinen und während der Pulsmarkierung neusynthetisierten ^3H -markierten Matrixproteinen zu unterscheiden.

Der Nachweis von ^{35}S -markierten Matrixproteinen und von ^{35}S -markiertem Cytochrom c im Cytosol zeigt, daß ein erheblicher Anteil dieser Proteine artefiziell durch Auslaufen der Mitochondrien während der Zellfraktionierung in nichtmitochondriale Zellfraktionen gelangt ist. In den beschriebenen Experimenten waren bis zu 50 % des ursprünglich in den Mitochondrien lokalisierten Cytochrom c bzw. der Matrixproteine im Cytosol und in der Mikrosomenfraktion nachweisbar.

Neusynthetisierte extramitochondriale Peptidketten sollten ausschließlich mit ^3H -Leucin markiert sein. Jegliche ^{35}S -Markierung muß daher aus den Mitochondrien stammen. Somit ist es mög-

lich, die immunpräzipitierte Radioaktivität aus nichtmitochondrialen Zellfraktionen mit der von ausgelaufenen Mitochondrienproteinen stammenden ^3H -Radioaktivität zu korrigieren.

Nach diesem Korrekturverfahren konnte nur für die Matrixproteine ein extramitochondrialer Pool nachgewiesen werden. Erst nach Korrektur der ^3H -Radioaktivität der pulsmarkierten Matrixproteine des Cytosols erhält man eine charakteristische Precursor-Produkt-Kinetik.

Der Nachweis extramitochondrialer Matrix-Pools in vivo wird auch durch die in vitro-Proteinsynthese im Zellhomogenat bestätigt. Auch in diesem System können aus dem Cytosol Matrixproteine präzipitiert werden, deren spezifische ^3H -Markierung nach Chase-Zugabe abnimmt, während die spezifische ^3H -Markierung der Matrixproteine in den Mitochondrien zunimmt.

Die Frage nach dem wirklichen Ort des extramitochondrialen Matrix-Pools muß allerdings offen bleiben, da es experimentell derzeit nicht möglich ist, abzuschätzen, inwieweit das endoplasmatische Retikulum oder andere Zellorganellen während der Fraktionierung ihren Inhalt artefiziell an das Cytosol abgeben.

Der Nachweis und die Lokalisierung eines extramitochondrialen Pools von Cytochrom c durch Puls- und Puls-Chase-Experimente ist bisher von einigen Arbeitsgruppen versucht worden (Über-sichten siehe (12, 42)). Diese Experimente wurden an Leberzellen durch Injektion von ^{14}C -Leucin oder radioaktiven Häm-Vorstufen in Ratten durchgeführt. In einer Reihe von Arbeiten wird behauptet, daß in Rattenleber-Zellen Cytochrom c am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert wird, in anderen Publikationen, daß nur das Apo-Cytochrom c am rauen Retikulum gebildet und in die Mitochondrien transportiert wird, wo die Kopplung mit der Häm-Gruppe erfolgt.

Die publizierten Experimente lassen allerdings den Nachweis von neusynthetisiertem Cytochrom c in der Mikrosomenfraktion fraglich erscheinen. Ein wesentlicher Mangel besteht in der ungenügenden Berücksichtigung artefizieller Umverteilungen von Cyto-

chrom c während der Zellfraktionierung, z. B. durch Auslaufen von neueingebautem Cytochrom c aus den Mitochondrien. Weiterhin wurde die Identifizierung von Cytochrom c bzw. Apo-Cytochrom c in fast allen Fällen nur unbefriedigend durchgeführt.

Vergleichende Untersuchungen an Neurospora-Mitochondrien, die in Gegenwart unterschiedlicher Magnesium-Konzentrationen isoliert wurden, führen zu folgenden Aussagen:

1. Mitochondrienpräparationen, die in Mg-haltigem Medium isoliert werden, enthalten neben den mitochondrialen 73-S Ribosomen zusätzlich und quantitativ überwiegend cytoplasmatische 79-S Ribosomen.
2. Die cytoplasmatischen Ribosomen gelangen in Gegenwart von Mg-Ionen als Kontamination, größtenteils gebunden an mikrosomale Vesikel, in die Mitochondrienpräparationen. Außenmembran-gebundene Ribosomen sind nicht nachweisbar.

Diese Untersuchungen liefern somit weitere Argumente gegen den bereits auf der Basis von in vivo- und in vitro-Pulsmarkierungsexperimenten ausgeschlossenen Transport mitochondrialer Proteine durch direkte Kopplung von Translation und Translokation durch Außenmembran-gebundene cytoplasmatische Ribosomen.

5.3. Diskussion möglicher Mechanismen für den Transport von cytoplasmatisch synthetisierten Mitochondrienproteinen

Nach Ausschluß eines Transports durch Außenmembran-gebundene Ribosomen zumindest für den größten Teil der cytoplasmatisch synthetisierten Mitochondrienproteine stellen sich die Fragen:

- a) An welcher Art von cytoplasmatischen Ribosomen werden mitochondrialen Peptidketten translatiert?
- b) Wo sind extramitochondriale Polypeptid-Vorstufen mitochondrialer Proteine nach ihrer Ablösung von den Ribosomen lokalisiert?

Mit den anfangs skizzierten Modellen B und C vereinbar sind verschiedene Möglichkeiten des Transports. Im wesentlichen bietet sich eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums am Transport oder ein Transport über gelöste Vorstufen im Cytosol an.

Experimentelle Anhaltspunkte für eine Synthese von mitochondrialen Proteinen am rauhen endoplasmatischen Retikulum und den anschließenden Transport dieser Proteine in die Mitochondrien liegen bisher nur für Leberzellen vor (Übersicht siehe (12)). Sie basieren auf der Beobachtung, daß nach Pulsmarkierung mit radioaktiven Aminosäuren aus der Mikrosomenfraktion Cytochrom c (oder das Apoprotein) und Glutamat-Dehydrogenase extrahiert werden können, die verglichen mit den aus Mitochondrien isolierten Proteinen, wesentlich schneller und mit größerer spezifischer Radioaktivität markiert werden. Die Kinetik dieser Proteine aus Mikrosomen zeigt eine Precursor-Produkt-Beziehung.

Aus morphologischen Beobachtungen an tierischen Zellen, an Zellen aus höheren Pflanzen, an Pilzen und an Protozoen ist eine direkte Kontinuität zwischen den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der mitochondrialen Außenmembran vermutet worden.

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang sind Spekulationen über die generelle Funktion des endoplasmatischen Retikulums in nichtsekretorischen Zellen (64 - 67, 122). Sie schließen sowohl die

Synthese und den Transport von Zellwandkomponenten, die Synthese von Membranproteinen, die Synthese von cytosolischen Proteinen, deren Translation einer hormonellen Regulation unterliegt als auch eine Bedeutung des Retikulums für die Biogenese von Zellorganellen wie Lysosomen, Glyoxysomen und Mitochondrien ein.

Sie basieren auf der Beobachtung, daß in vielen nichtsekretorischen Zellen ein erheblicher Anteil der gesamten Ribosomen in membrangebundener Form vorliegt. Für sekretorische Zellen wie Leberzellen beträgt dieser Anteil mehr als 80 %; für nichtsekretorische Zellen wird dieser Anteil bei Skelettmuskelzellen mit ca. 10 %, bei HeLa-Zellen, die nicht mehr als 2 % ihres neu-synthetisierten Proteins exportieren, mit ca. 15 % veranschlagt.

Für *Neurospora crassa* Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase werden von Grinwich und Trevithick (123) 20 - 25 % der gesamten Ribosomen als membrangebunden beschrieben. Nach eigenen Befunden wurde dieser Anteil zu 5 - 10 % abgeschätzt. Unter den gewählten Kulturbedingungen können im Kulturfiltrat nur Spuren von Protein nachgewiesen werden. Eine Sekretion von Proteinen kann somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Direkte Hinweise auf eine mögliche Bedeutung des endoplasmatischen Retikulums in *Neurospora* liefern die in dieser Arbeit beschriebenen in vivo- und in vitro-Puls- und Puls-Chase-Markierungsexperimente. In beiden Systemen zeigt ausschließlich die Mikrosomenfraktion eine Precursor-Produkt-Kinetik. Nach Chase-Zugabe verschwinden die radioaktiven neusynthetisierten Peptidketten mit einer Kinetik, die dem Erscheinen neusynthetisierter Peptide in den Mitochondrien entspricht. Dieser Befund könnte bedeuten, daß mitochondriale Proteine an membrangebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert werden, zunächst in das Lumen des Retikulums gelangen und anschließend in die Mitochondrien transportiert werden. Bei einer Synthese von Proteinen an den Ribosomen des Retikulums und einer direkten Abgabe der Ketten in das Cytosol sollte man eher eine der Ribosomenfraktion ähnliche Kinetik erwarten. Eine andere Erklärung für die beobachtete Kinetik könnte eine Überlagerung verschiedener Einzelkinetiken sein, etwa bei gleichzeitiger

Neubildung von Mikrosomenproteinen und Ablösung neugebildeter Polypeptidketten von den membrangebundenen Ribosomen.

Die erste Interpretation wird gestützt durch die in vitro-Proteinsynthese in isolierten Zellfraktionen. Isolierte Mikrosomen zeigen nach Einbau von ^3H -Leucin eine Sättigungskinetik. Wenn die Mikrosomen dagegen mit Mitochondrien inkubiert und dann der in vitro-Proteinsynthese unterworfen werden, zeigen die Mikrosomen eine Precursor-Produkt-Kinetik. Für eine eindeutige Identifizierung einzelner Proteine in diesem System war die eingebaute Radioaktivität zu gering.

Im Gegensatz zu dieser Interpretation steht der Befund, daß in pulsmarkierten Zellen ein extramitochondrialer Matrix-Pool mit einer typischen Precursor-Produkt-Kinetik im Cytosol gefunden wird. Die Frage, ob diese neusynthetisierten Matrixproteine ursprünglich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert waren und während der Zellfraktionierung artefiziell in das Cytosol gelangt sind, kann z. Z. nicht beantwortet werden.

Neusynthetisiertes Cytochrom c und CAT-bindendes Protein konnten aus nichtmitochondrialen Zellfraktionen mit den verwendeten Antikörpern nicht präzipitiert werden. Dagegen können mit Antikörpern gegen Cytochrom c, gegen CAT-bindendes Protein und gegen SDS-behandelte Cytochromoxidase aus dem Cytosol hochmolekulare Proteinkomponenten präzipitiert werden (Molekulargewichte zwischen 40 000 und 80 000). Die Pulsmarkierung dieser Komponenten nimmt nach Chase-Zugabe nicht ab. Dies spricht gegen eine spezifische Präzipitation möglicher hochmolekularer Vorstufen. Die Frage, inwieweit es sich um unspezifische Mitfällungen handelt oder ob diese Komponenten in funktioneller Beziehung zu den betreffenden Proteinen stehen, wird gegenwärtig untersucht.

Eine andere Annäherung an das Problem der Lokalisierung mitochondrialer Proteine im extramitochondrialen Raum ist die immunologische Identifizierung naszierender Peptidketten an freien oder membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen. In dieser Arbeit wurde versucht, pulsmarkierte freie und membrangebundene cytoplasmatische Ribosomen nach Auftrennung in einem Dichtegradienten mit Antikörpern gegen die gesamten mitochondrialen Matrixproteine zu präzipitieren. Diese Experimente erlauben auf

Grund unspezifischer Mitfällungen keine Aussagen über den Syntheseort der Matrixproteine.

Die Anwendung spezifischer Antikörper zur Lokalisierung und Isolierung von Polysomen, die ein bestimmtes Protein synthetisieren, ist für eine Vielzahl von Proteinen beschrieben worden (64). Eine kritische Durchsicht dieser Arbeiten läßt erkennen, daß die Anwendbarkeit einer solchen experimentellen Annäherung infolge unspezifischer Wechselwirkungen sehr begrenzt ist. Sie verspricht nur dann eine Aussagefähigkeit, wenn Proteine untersucht werden, die einen hohen Anteil an der gesamten Proteinsynthese der Zelle haben.

5.4. Ausblick

Für die weitere Aufklärung des Transportmechanismus erscheint das in vivo-System weniger geeignet. Richtungsweisend für weitere Experimente ist der Befund, daß nach in vitro-Proteinsynthese im Zellhomogenat das Transportsystem für neusynthetisierte Mitochondrienproteine noch funktionsfähig ist. Wünschenswert wären bessere Kriterien für den spezifischen in vitro-Einbau der Proteine in ihren funktionellen Wirkungsort in den Mitochondrien, etwa eine Kontrolle mit spezifischen Antikörpern gegen isolierte cytosolische Proteine.

Ziel der Untersuchungen muß es sein, das Transportsystem schrittweise aus seinen Bestandteilen zu rekonstituieren. In diesem Sinne wurden die in vitro-Experimente an isolierten Zellfraktionen begonnen. Die relativ niedrigen Einbauraten erfordern eine Optimierung des Systems, um die Synthese und den Transport spezifischer Proteine nachweisen zu können. Für weitere Versuche sollte auch eine Ergänzung der bereits eingesetzten Antikörper z. B. durch Antikörper gegen die F_1 -ATPase und durch Antikörper gegen spezifische Matrixproteine angestrebt werden.

Aufschluß darüber, inwieweit bereits in die Mitochondrien integrierte Matrixproteine für das Transportsystem verwertbar sind, kann von Experimenten erwartet werden, in welchen z. B. das zellfreie System des Homogenates mit extrahierten ^{35}S -markierten Matrixproteinen inkubiert wird.

Zur Lokalisierung des Syntheseorts mitochondrialer Proteine könnten isolierte m-RNS aus freien und membrangebundenen Ribosomen für eine in vitro-Translation in einem heterologen System eingesetzt werden. Durch den Nachweis spezifischer Mitochondrienproteine in diesem System könnte im Sinne der von Blobel und Dobberstein (46, 47) für Exportproteine wahrscheinlich gemachten 'Signal-Sequenz-Hypothese' überprüft werden, ob extramitochondriale Peptidvorstufen an ihren aminoterminalen Enden Sequenzen tragen, die ausschließlich für die Erkennung der Membran und eventuell für die Translokation durch die Membran von Bedeutung sind.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Synthese und der Transport von cytoplasmatisch synthetisierten Proteinen in die Mitochondrien werden in zwei verschiedenen experimentellen Systemen untersucht:
 - a) in vivo durch Puls- und Puls-Chase- Markierung von Neurospora-Zellen mit ^3H -Leucin und durch Erfassung der Markierungskinetiken von Zellfraktionen und von immunologisch identifizierbaren Mitochondrienproteinen;
 - b) in vitro durch den Einbau von ^3H -Leucin in ein zellfreies Proteinsynthese-System (Zellhomogenat) und die Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Markierung von Zellfraktionen und immunpräzipitierten Mitochondrienproteinen.
2. Die Markierungscharakteristika der Zellfraktionen des in vivo- und in vitro-Systems stimmen weitgehend überein.
3. Nach Pulsmarkierung von Zellen in vivo bei 8°C und von einem Zellhomogenat in vitro bei 25°C mit ^3H -Leucin werden die Proteine der Mitochondrien mit einer deutlichen Verzögerung und mit geringerer Geschwindigkeit markiert als die des Cytosols. Auch nach Abschluß des Einbaus von ^3H -Leucin in das Cytosol werden die Mitochondrien weiter markiert.
4. Durch Immunpräzipitation aus solubilisierten Mitochondrien ist es möglich, die Markierung bestimmter Mitochondrienproteine zu verfolgen. Mit spezifischen Antikörpern aus Mitochondrien präzipitierte Proteine wie das Cytochrom c, das Carboxyatractylosid-bindende Protein, die Matrixproteine und die Proteine der mitochondrialen Ribosomen werden nach in vivo-Pulsmarkierung mit unterschiedlicher Kinetik markiert.
5. Nach in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in das Zellhomogenat können aus den Mitochondrien ^3H -Leucin markiertes Cytochrom c (oder das Apo-Cytochrom c) und ^3H -Leucin markierte Matrixproteine präzipitiert werden. Dies spricht für eine Funktionsfähigkeit des Transportsystems auch nach Aufschluß der Zellen.

6. Auch nach Blockierung der cytoplasmatischen Translation mit Cycloheximid nach in vivo-Pulsmarkierung von Zellen erfolgt ein Einbau von neusynthetisierten Polypeptiden in die Mitochondrien.
7. Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) hemmt das Erscheinen neugebildeter Proteine in den Mitochondrien, insbesondere des Cytochrom c, nicht aber die Synthese von mitochondrien-spezifischen Proteinen im in vitro-System.
8. Mit spezifischen Antikörpern gegen die gesamten Matrixproteine kann im Cytosol ein extramitochondrialer Vorstufen-Pool mit charakteristischer Precursor-Produkt-Kinetik nachgewiesen werden. Dieser Verlauf der Kinetik des Matrix-Pools im Cytosol ergibt sich erst nach Berücksichtigung der Matrix-Proteine, die artefiziell während der Zellfraktionierung aus den Mitochondrien in das Cytosol gelangt sind. Eine solche Korrektur ist möglich durch Doppelmarkierung, d.h. durch homogene Markierung der Zellen mit ^{35}S -Sulfat und Puls-Markierung mit ^3H -Leucin. Damit ist es möglich, zwischen alten, bereits zu Beginn der Pulsmarkierung in den Mitochondrien lokalisierten ^{35}S -markierten Matrixproteinen und während der Pulsmarkierung neusynthetisierten ^3H -markierten Matrixproteinen zu unterscheiden. In der Mikrosomenfraktion konnten neusynthetisierte Matrixproteine nur zu einem geringen Ausmaß gefunden werden.
9. Die Summe der dargelegten Befunde erlaubt Aussagen über den Transport von Proteinen in die Mitochondrien:
 - a) Nach der Synthese von mitochondrien-spezifischen Proteinen an cytoplasmatischen Ribosomen gelangen die abgelösten Polypeptidketten zunächst in einen extramitochondrialen Vorstufen-Pool, ehe sie in die Mitochondrien transportiert werden.
 - b) Die Synthese und der Transport von Proteinen in die Mitochondrien sind nicht gekoppelt, d.h. auch nach Blockierung der Translation werden mitochondrien-spezifische Polypeptidketten aus ihrem extramitochondrialen Vorstufen-Pool in die Mitochondrien transportiert.

Somit kann eine gekoppelte Translation und vektorielle Translokation durch Außenmembran-gebundene Ribosomen ausgeschlossen werden.

10. Der Ausschluß eines Transports über Außenmembran-gebundene Ribosomen wird gestützt durch die elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchung von Mitochondrien-Präparationen, die unter Bedingungen isoliert wurden, welche die Bindung von Ribosomen und Membranen aufrechterhalten. Sie liefern keine Hinweise für direkt an der mitochondrialen Außenmembran gebundene cytoplasmatische Ribosomen. Die Anwesenheit von Mg^{++} im Isolierungsmedium führt zu einer erheblichen Verunreinigung der Mitochondrienfraktion durch Mikrosomen und damit zu einer entsprechenden Verunreinigung mit membrangebundenen cytoplasmatischen Ribosomen.
11. Auf der Basis der in dieser Arbeit erhobenen Befunde stehen zwei mögliche Arbeitshypothesen zur Diskussion:
 - a) Cytoplasmatisch synthetisierte Mitochondrienproteine werden an membrangebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums gebildet und gelangen durch vektorielle Translokation in das Lumen des Retikulums. Anschließend erfolgt der weitere Transport durch retikuläre Vesikel oder durch ein kontinuierliches System der mitochondrialen Außenmembran und den Membranen des Retikulums.
 - b) Cytoplasmatisch synthetisierte Mitochondrienproteine werden an freien oder/und membrangebundenen Ribosomen translatiert und werden in das Cytosol abgegeben. Sie gelangen als lösliche Vorstufen zu den Mitochondrien und werden dort an spezifische Rezeptoren gebunden. Nach der Bindung erfolgt für die Proteine der Innenmembran die Integration in die Membran, für die Matrixproteine die Translokation durch die Innenmembran. Nach dieser Hypothese stellt die mitochondriale Außenmembran keine Barriere dar, da sie entweder permeabel für die Vorstufenproteine ist oder Integration und Transport an Fusionsstellen von Außen- und Innenmembran stattfindet.

7. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	Chloramphenicol
CAT	Carboxyatratylosid
CCCP	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon
CHI	Cycloheximid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
m-RNS	messenger-Ribonucleinsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat in reduzierter Form
OD	Optische Dichte
OSCP	Oligomycin-Sensitivity-Confering-Protein
RNS	Ribonucleinsäure
SDH	Succinat-Cytochrom c-Reduktase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TIM	Triosephosphatisomerase
TNS	Tri-isopropylnaphtalin-sulfonsäure
TRA	Triäthanolamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

8. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Brosemer, R. W., Vogell, W. und Bücher, Th. (1963) Biochem. Z. 338, 854 - 910
- (2) Luck, D. J. L. (1963) J. Cell Biol. 16, 483 - 499
- (3) Ephrussi, B. (1953) Nucleo-cytoplasmic relations in micro-organisms, University Press, Oxford
- (4) Ephrussi, B. und Slonimski, P. (1955) Nature 176, 1207 - 1208
- (5) Luck, D. J. L. und Reich, E. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. 52, 931 - 938
- (6) Borst, P. und Ruttenberg, G. J. (1966) in "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria", eds. Tager, J. M. et al., Elsevier, BBA Library, Vol. 7, Amsterdam, Seite 454 - 458
- (7) Reich, E. und Luck, D. J. L. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 1600 - 1608
- (8) Ashwell, M. und Work, T. S. (1970) Ann. Rev. Biochem. 39, 251 - 290
- (9) Borst, P. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 333 - 376
- (10) Lloyd, D. (1974) The Mitochondria of Microorganisms, Academic Press, London
- (11) Beattie, D. S. (1971) Sub-Cell. Biochem. 1, 1 - 23
- (12) Schatz, G. und Mason, T. L. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 51 - 87
- (13) Weiss, H., Sebald, W. und Bücher, Th. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 19 - 26
- (14) Sebald, W., Weiss, H. und Jackl, G. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 413 - 417

- (15) Sebald, W., Machleidt, W. und Otto, J. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 311 - 324
- (16) Mason, T. L. und Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1355 - 1360
- (17) Rubin, M. S. und Tzagoloff, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4275 - 4279
- (18) Weiss, H. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456, 291 - 313
- (19) Jackl, G. und Sebald, W. (1975) Eur. J. Biochem. 54, 97 - 106
- (20) Tzagoloff, A. und Meagher, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 594 - 603
- (21) Tzagoloff, A., Rubin, M. S. und Sierra, M. F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301, 71 - 104
- (22) Küntzel, H. (1969) Nature 222, 142 - 146
- (23) Neupert, W., Sebald, W., Schwab, A. J., Massinger, P. und Bücher, Th. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 589 - 591
- (24) Neupert, W., Sebald, W., Schwab, A. J., Pfaller, A. und Bücher, Th. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 585 - 588
- (25) Neupert, W., Massinger, P. und Pfaller, A. (1971) in "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts", eds. Boardman, N. K. et al., North Holland Publishing Company, Amsterdam, Seite 328 - 338
- (26) Groot, G. S. P. (1974) in "The Biogenesis of Mitochondria", eds. Kroon, A. M. und Saccone, C., Academic Press, London, New York, Seite 443 - 452
- (27) Brega, A. und Baglioni, C. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 415 - 422
- (28) Lizardi, P. M. und Luck, D. J. L. (1972) J. Cell Biol. 54, 56 - 74

- (29) Neupert, W. (1977) in "Horizons in Biochemistry and Biophysics", eds. Quagliariello, E., Palmieri, F. und Singer, T. P., Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Mass., im Druck
- (30) Linnane, A. W., Still, J. (1956) Aust. J. Sci. 18, 165
- (31) Schatz, G., Tuppy, H. und Klima, J. (1963) Z. Naturforsch. 18, 145 - 153
- (32) Mackler, B., Douglas, H. C., Will, S., Hawthorne, D. C. und Mahler, H. R. (1965) Biochemistry 4, 2016 - 2020
- (33) Perlman, P. S. und Mahler, H. R. (1970) Bioenergetics, 1, 113 - 138
- (34) Riethmüller, G. und Tuppy, H. (1964) Biochem. Z. 340, 413 - 420
- (35) Roodyn, D. B., Suttie, J. W. und Work, T. S. (1962) Biochem. J. 83, 29 - 40
- (36) Munkres, K. D. und Richards, F. M. (1965) Arch. Biochem. Biophys. 109, 457 - 465
- (37) Munkres, K. D. (1968) Ann. NY Acad. Sci. 151, 294
- (38) Schatz, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2192 - 2199
- (39) Tzagoloff, A. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5027 - 5033
- (40) Tzagoloff, A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1545 - 1551
- (41) Sherman, F. und Stewart, J. W. (1971) Ann. Rev. Genet. 5, 257 - 296
- (42) Gonzalez-Cadavid, N.F. (1974) Sub-Cell. Biochem. 3, 275 - 309
- (43) Hackenberg, H. (1975) Diplomarbeit, München
- (44) Swanson, R. F. (1971) Nature New Biol. 231, 31 - 34

- (45) Avadhani, N. G., Lewis, F. S. und Rutman, R. J. (1975) Sub-Cell Biochem. 4, 93 - 145
- (46) Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975) J. Cell Biol. 67, 835 - 851
- (47) Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975) J. Cell Biol. 67, 852 - 862
- (48) Mechler, B. und Vassalli, P. (1975) J. Cell Biol. 67, 25 - 37
- (49) Kellems, R. E. und Butow, R. A. (1972) J. Biol. Chem. 247, 8043 - 8050
- (50) Kellems, R. E., Allison, V. F. und Butow, R. A. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3297 - 3303
- (51) Kellems, R. E. und Butow, R. A. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3304 - 3310
- (52) Kellems, R. E., Allison, V. F. und Butow, R. A. (1975) J. Cell Biol. 65, 1 - 14
- (53) Kellems, R. E., Allison, V. F. und Butow, R. A. (1974) in "The Biogenesis of Mitochondria", eds. Kroon, A. M. und Saccone, C., Academic Press, London, New York, Seite 511 - 523
- (54) Keyhani, E. (1973) J. Cell Biol. 58, 480 - 484
- (55) Gaitskhoki, V. S., Kisselev, O. I., Klimov, N. A., Monakhov, N. K., Mukha, G. V., Schwartzman, A. L. und Neifakh, S. A. (1974) FEBS Lett. 43, 151 - 154
- (56) Parsons, D. F., Williams, G. R., Thompson, W., Wilson, D. F. und Chance, B. (1967) in "Mitochondrial Structure and Compartmentation", eds. Quagliariello, E. et al., Adriatica (Libreria) dell'Universita, Bari, Italy, Seite 29 - 70
- (57) Ruby, J. R., Dyer, R. F. und Skalko, R. G. (1969) Z. Zellforsch. 97, 30 - 37

- (58) Bracker, Ch. E. und Grove, S. N. (1971) Protoplasma 73, 15 - 34
- (59) Francke, W. W. und Kartenbeck, J. (1971) Protoplasma 73, 35 - 41
- (60) Morr  , D. J., Merritt, W. D. und Lembi, C. A. (1971) Protoplasma 73, 43 - 49
- (61) Tewari, J. P. und Malhotra, S. K. (1973) Sub-Cell. Biochem. 2, 287 - 293
- (62) Matile, Ph. (1965) Z. Zellforsch. 65, 884 - 896
- (63) Datema, R., Agsteribbe, E. und Kroon, A. M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 335, 386 - 395
- (64) Rolleston, F. S. (1974) Sub-Cell. Biochem. 3, 91 - 117
- (65) Palade, G. (1975) Science 189, 347 - 358
- (66) McIntosh, P. R. und O'Toole, K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457, 171 - 212
- (67) Sabatini, D. D. und Kreibich, G. (1976) in "The Enzymes of Biological Membranes", ed. Martonosi, A., John Wiley & Sons, London, New York, Vol. 2, Seite 531 - 579
- (68) Rücker, A. v., Werner, S. und Neupert, W. (1974) FEBS Lett. 47, 290 - 294
- (69) Neupert, W., Miller, F., Michel, R. und Hallermayer, G. (1977) in "Methods in Enzymology", eds. Fleischer, S. und Packer, L., Academic Press, London, im Druck
- (70) Küntzel, H. und Noll, H. (1967) Nature 215, 1340 - 1345
- (71) Schmitt, H. (1970) Eur. J. Biochem. 17, 278 - 283
- (72) Lizardi, P. M. und Luck, D. J. L. (1971) Nature New Biol. 229, 140 - 142

- (73) Agsteribbe, E., Datema, R. und Kroon, A. M. (1974) in "The Biogenesis of Mitochondria", eds. Kroon, A. M. und Saccone, C., Academic Press, London, New York, Seite 305 - 314
- (74) Van den Bogert, C. und De Vries, H. (1976) Biochim. Biophys. Acta 442, 227 - 238
- (75) Weiss, H., Jagow, G. v., Klingenberg, M. und Bücher, Th. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 75 - 82
- (76) Forrester, I. T., Nagley, P. und Linnane, A. W. (1970) FEBS Lett. 11, 59 - 61
- (77) Groot, P. H. E., Aaij, C. und Borst, P. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1321 - 1327
- (78) Borst, P. und Grivell, L. A. (1971) FEBS Lett. 13, 73 - 88
- (79) Grivell, L. A., Reijnders, L. und Borst, P. (1971) Eur. J. Biochem. 19, 64 - 72
- (80) Edelman, M., Verma, I. M., Herzog, R., Galun, G. und Littauer, U. Z. (1971) Eur. J. Biochem. 19, 372 - 378
- (81) Pene, J. J., Knight, E. und Darnell, J. E. (1968) J. Mol. Biol. 33, 609 - 623
- (82) King, H. W. S. und Gould, H. (1970) J. Mol. Biol. 51, 687 - 702
- (83) Payne, P. I. und Dyer, T. A. (1972) Nature New Biol. 235, 145 - 147
- (84) Leaver, Ch., J. und Harmey, M. A. (1976) Biochem. J. 157, 275 - 277
- (85) Stöffler, G., persönliche Mitteilung
- (86) Michel, R. und Neupert, W. (1973) Eur. J. Biochem. 36, 53 - 67

- (87) Ojala, D. und Attardi, G. (1972) *J. Mol. Biol.* 65, 273 - 289
- (88) Fleischer, S. und Kervina, M. (1974) in "Methods in Enzymology", eds. Fleischer, S. und Packer, L., Academic Press, London, Vol. XXXI, Seite 6 - 41
- (89) Parsons, D. F., Williams, G. R. und Chance, B. (1966) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 137, 643
- (90) Sottocasa, G. L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. und Bergstrand, A. (1967) *J. Cell Biol.* 32, 413 - 438
- (91) Aronson, N. N. und Touster, O. in "Methods in Enzymology", eds. Fleischer, S. und Packer, L., Academic Press, London, Vol. XXXI, Seite 91 - 102
- (92) Adelman, M. R., Blobel, G. und Sabatini, D. D. (1973) *J. Cell Biol.* 56, 191 - 205
- (93) Dallner, G. (1974) in "Methods in Enzymology", eds. Fleischer, S. und Packer, L., Academic Press, London, Vol. XXXI, Seite 191 - 201
- (94) Zalokar, M. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 46, 423 - 432
- (95) Schwab, A. J. (1972) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
- (96) Rücker, A. v. (1976) Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Universität München
- (97) Schneider, D. L., Kagawa, Y. und Racker, E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4074 - 4079
- (98) Singer, S. J. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 43, 805 - 833
- (99) Harmon, H. J., Hall, J. D. und Crane, F. L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 344, 119 - 155

- (100) Vignais, P. V. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456, 1 - 38
- (101) Klingenberg, M. (1976) in "The Enzymes of Biological Membranes", ed. Martonosi, A., John Wiley & Sons, London, New York, Vol. 3, Seite 383 - 438
- (102) Heller, J. und Smith, E. L. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3158 - 3164
- (103) Zimmermann, R., persönliche Mitteilung
- (104) Rich, A. (1968) in "The Molecular Basis of Life" - Readings from Scientific American, W. H. Freeman and Company, San Francisco und London, Seite 188 - 197
- (105) Michel, R. (1972) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
- (106) Holme, G., Boyd, S. L. und Sehon, A. H. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 240 - 245
- (107) Delovitch, T. L., Boyd, S. L., Tsay, H. M., Holme, G. und Sehon, A. H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 299, 621 - 633
- (108) Spirin, A. S., Belitsina, N. V., Gaal, A. Ö. und Pozdnyakova, T. M. (1968) Molekul. Biol. 2, 95 - 102
- (109) Noll, H. (1967) Nature 215, 360 - 363
- (110) Leaver, C. J. und Ingle, J. (1971) Biochem. J. 123, 235 - 243
- (111) Kirby, K. S. (1968) in "Methods in Enzymology", eds. Colowick, S. P. und Kaplan, N. O., Academic Press, New York und London, Vol. XII/B Seite 87
- (112) Loening, U. E. (1969) Biochem. J. 113, 131 - 138
- (113) Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G. (1953) Z. Naturforsch. 8b, 555 - 577

- (114) Lowry, H. O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
- (115) Arrigoni, O. und Singer, Th. P. (1962) Nature 193, 1256
- (116) Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972) Science 175, 720 - 731
- (117) Roth, T. F., Cutting, J. A. und Atlas, S. B. (1976) J. Supramol. Structure 4, 527 - 548
- (118) Ernster, L. und Kylenstierna, B. in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts", ed. Racker, E., Van Nostrand Reinhold Co., London, Seite 172 - 212
- (119) Wojtczak, L. und Zaluska, H. (1969) Biochim. Biophys. Acta 193, 64 - 72
- (120) Wojtczak, L. und Sottocasa, G. L. (1972) J. Membrane Biol. 7, 313 - 324
- (121) Kuriyama, Y. und Luck, D. J. L. (1973) J. Cell Biol. 59, 776 - 784
- (122) Tata, J. R. (1971) Sub-Cell. Biochem. 1, 83 - 89
- (123) Grinwich, K. D. und Trevithick, J. R. (1973) J. General Microbiol. 79, 173 - 179

LEBENS LAUF

Am 10. März 1948 wurde ich als zweiter von drei Söhnen des Diplom-Chemikers Dr. Rudolf Hallermayer und seiner Ehefrau Marianne, geb. Müller, in Friedberg geboren.

1954 trat ich in die Volksschule Friedberg ein, von 1958 bis 1961 besuchte ich das Holbein-Gymnasium in Augsburg. Im Herbst 1961 wechselte ich auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Schrobenhausen über, wo ich 1967 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der Universität München das Studium der Chemie, das ich im Februar 1972 mit der Diplom-Chemiker-Hauptprüfung abschloß. Von Mai 1972 bis Dezember 1972 fertigte ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München meine Diplomarbeit "Über die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Außen- und Innenmembranen von *Neurospora crassa* und Rattenleber" an. Anschließend entstand an diesem Institut die vorliegende Doktorarbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Th. Bücher und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. W. Neupert.

Seit 1974 bin ich mit meiner Frau Gertrud, geb. Frei, verheiratet.

